

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 7 月 10 日 (10.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/055993 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 5/10,
15/00, A01K 67/027, A01H 5/00, C07K 16/28, A61K
39/395, A61P 35/00, 37/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/13534

(22) 国際出願日: 2002 年 12 月 25 日 (25.12.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2001-392753
2001 年 12 月 25 日 (25.12.2001) JP
特願 2002-106948 2002 年 4 月 9 日 (09.04.2002) JP
特願 2002-319975 2002 年 11 月 1 日 (01.11.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和
醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO.,
LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一
丁目 6 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 設楽 研也 (SHI-
TARA, Kenya) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市旭町
3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所
内 Tokyo (JP). 桜田 幹子 (SAKURADA, Mikiko) [JP/JP];
〒194-8533 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和
醗酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 内田 和久
(UCHIDA, Kazuhisa) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田
市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京研
究所内 Tokyo (JP). 新川 豊英 (SHINKAWA, Toyohide)

[JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号
協和醗酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 佐藤
光男 (SATO, Mitsuo) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田
市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京
研究所内 Tokyo (JP). 中野 了輔 (NAKANO, Ryosuke)
[JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番
6 号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特
許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 明細書とは別に規則 13 の 2 に基づいて提出された
生物材料の寄託に関する表示。

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: COMPOSITION OF ANTIBODY SPECIFICALLY BINDING TO CD20

(54) 発明の名称: CD20 に特異的に結合する抗体組成物

(57) Abstract: A composition comprising an antibody molecule which binds specifically to CD20 and has an N-glycoside bond complex type sugar chain Fc domain; cells or a transgenic nonhuman animal or plant producing the composition; a process for producing the antibody composition; and drugs containing the antibody composition.

(57) 要約:

CD20 に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖 Fc 領域を有する抗体分子か
らなる組成物、該組成物を生産する細胞またはトランスジェニック非ヒト動物ある
いは植物、該抗体組成物の製造方法および該抗体組成物を含有する医薬を提供する。



WO 03/055993 A1

明 細 書

CD20に特異的に結合する抗体組成物

技術分野

本発明は、B細胞性リンパ腫などのCD20陽性細胞が関与する疾患の治療に有用な抗体組成物、抗体組成物を製造するための細胞、該細胞を用いた抗体組成物の製造方法に関する。

背景技術

抗体は、高い結合活性、結合特異性及び血中での高い安定性を有することから、ヒトの各種疾患の診断、予防及び治療への応用が試みられてきた〔モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., Chapter 2.1 (1995)〕。また、遺伝子組換え技術を利用して、ヒト以外の動物の抗体からヒト型キメラ抗体或いはヒト型相補性決定領域（以下、CDRと表記する）移植抗体の様なヒト化抗体を作製することが試みられている。ヒト型キメラ抗体とは、抗体可変領域（以下、V領域と表記する）がヒト以外の動物の抗体で、定常領域（以下、C領域と表記する）がヒト抗体である抗体である。ヒト型CDR移植抗体とは、ヒト抗体のCDRをヒト以外の動物の抗体のCDRと置換した抗体である。

哺乳類の抗体には、IgM、IgD、IgG、IgA、IgEの5種類のクラスが存在することが明らかとなっているが、ヒトの各種疾患の診断、予防及び治療には血中半減期が長く、各種エフェクター機能を有する等の機能特性からヒトIgGクラスの抗体が主として利用されている〔モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., Chapter 1 (1995)〕。ヒトIgGクラスの抗体は、更にIgG1、IgG2、IgG3、IgG4の4種類のサブクラスに分類されている。IgGクラスの抗体のエフェクター機能である抗体依存性細胞傷害活性（以下、ADCC活性と表記する）や補体依存性細胞傷害活性（以下、CDC活性と表記する）については、これまでに多数の研究が行われ、ヒトIgGクラスでは、IgG1サブクラスの抗体が最も高いADCC活性、CDC活性を有していることが報告されている〔ケミカル・イムノロジー (Chemical Immunology), 65, 88 (1997)〕。実際に、IgG1サブクラスの抗CD20キメラ抗体をサルに投与した場合に検出されるCD20陽性B細胞の除去が、IgG4サブクラスを用いた場合には検出されないことも報告されている〔バイオケミカル・ソサイエティ・トランスアクション

(Biochem. Soc. Trans.), 25, 705 (1997)]]。以上の観点から、市販の治療用抗体のうち、その効果発現に高いエフェクター機能を必要とする抗腫瘍ヒト化抗体の殆どはヒトIgG1サブクラスの抗体である。

CD20はBp35とも呼ばれる約35kDaのポリペプチドであり、モノクローナル抗体によってヒトBリンパ球特異抗原B1として同定された[ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.), 125, 1678 (1980)]。4回膜貫通型分子で、カルシウムチャンネルとして機能し、B細胞の活性化や増殖、分化に関与していると考えられている[イムノロジー・トゥデイ(Immunology Today), 15, 450(1994)]。CD20の発現はプレB細胞から成熟B細胞までに限られており、未分化細胞や、形質細胞には発現していない。また、90%以上のB細胞性非ホジキンリンパ腫に発現していること、抗体が結合しても細胞内に移行しないことなどの特徴も持っており、早くから抗CD20抗体によるB細胞リンパ腫の治療が試みられてきた[ブラッド(Blood), 69, 584(1987)]。しかしながら、当初用いられていたのはマウスモノクローナル抗体であり、ヒト体内にマウス抗体に対するヒト抗体(HAMA; Human Anti Mouse Antibody)が誘導されること、エフェクター機能を欠くことなどから、その治療効果は限られたものであった。したがって、遺伝子組換え技術を用いて、マウス抗体とヒトIgG1サブクラスの抗体とのキメラ抗体作製が検討された[ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.), 139, 3521(1987)、W088/04936]。更に、マウスモノクローナル抗体2B8を用いて作製されたヒトIgG1サブクラスのキメラ抗体IDEC-C2B8は、サルを用いた検討により生体内においてもCD20陽性細胞を除去する活性を有することが確認され[ブラッド(Blood), 83, 435(1994)、W094/11026]、臨床試験を経て、米国においてRituxanTM(IDEC社/Genentech社、Rituximabとも呼ばれるが、以下、RituxanTMと表記する)として1997年11月に上市された。

RituxanTMの米国における第III相試験は、小リンパ球性及び濾胞性リンパ腫166例に対して、375mg/m²/週の4週投与で行われ、奏効率は48% (完全寛解6%、部分寛解42%) であった[ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー(J. Clin. Oncol.), 16, 2825 (1998)]。RituxanTMの作用機序としては、ADCC活性、CDC活性に加え、CD20をクロスリンクさせることにより細胞にアポトーシスを誘導させる活性などが考えられている[カレント・オピニオン・イン・イムノロジー(Current Opinion in Immunology), 11, 541 (1999)]。CDC活性に関しては、標的となるBリンパ腫細胞によってその感受性が異なることから、その制御に関与していると考えられる補体阻

害分子CD55やCD59の機能を阻害することで、RituxanTMの治療効果を高められる可能性が議論されてきた[カレント・オピニオン・イン・イムノロジー (Current Opinion in Immunology), 11, 541 (1999)]。しかし、患者由来の腫瘍細胞でのそれらの阻害分子の発現や、インビトロにおけるCDC活性の感受性が、臨床における成績と必ずしも相関しないことも報告されてきている[ブラッド (Blood), 98, 1352 (2001)]。また、マウスにヒトBリンパ腫細胞株Raji細胞を移植したモデルを用いた検討において、抗体レセプター（以下、抗体レセプターをFc γ Rと表記する）を介したADCC活性が抗腫瘍効果に重要であることが示された[ネイチャー・メディシン (Nature Medicine), 6, 443 (2000)]。

RituxanTMと化学療法(CHOP; Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, Prednisone)との併用が検討されてきており、第II相試験において低悪性度および濾胞性リンパ腫40例に対して奏効率95% (完全寛解55%、部分寛解45%)と報告されているものの、CHOPに起因する副作用が見られた[ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー (J. Clin. Oncol.), 17, 268 (1999)]。また、他の治療用抗CD20抗体として、放射性同位元素標識抗体であるZevalin (IDEC社)、Bexxar (Corixa社)などが開発されているが、どちらもマウス抗体であることと、放射性同位元素が用いられていることから、強い毒性による副作用が懸念される。

ヒトIgG1サブクラスの抗体のADCC活性及びCDC活性の発現には、抗体Fc領域と、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、活性化されたマクロファージ等のエフェクター細胞表面上に存在する抗体レセプター及び各種補体成分との結合が必要であり、その結合については、抗体のヒンジ領域及びC領域の第2番目のドメイン（以下、C γ 2ドメインと表記する）内のいくつかのアミノ酸残基の重要性が示唆されている[ヨーロッパアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー (Eur. J. Immunol.), 23, 1098 (1993)、イムノロジー (Immunology), 86, 319 (1995)、ケミカル・イムノロジー (Chemical Immunology), 65, 88 (1997)]。RituxanTMに関しても、C γ 2ドメインのアミノ酸置換体を用いた検討により、主にCDC活性に重要なアミノ酸が同定されてきている[ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.), 164, 4178 (2000)、ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.), 166, 2571 (2001)]。

また、C γ 2ドメインに結合している糖鎖の重要性[ケミカル・イムノロジー (Chemical Immunology), 65, 88 (1997)]が示唆されている。糖鎖に関しては、ボイド (Boyd) らは、チャイニーズハムスター卵巣細胞（以下、CHO細胞と表記する）

或いはマウスミエローマNS0細胞（以下、NS0細胞と表記する）で生産したヒト型CDR移植抗体CAMPATH-1H（ヒトIgG1サブクラス）を各種糖分解酵素で処理し、糖鎖のADCC活性、CDC活性に対する影響を検討した結果、非還元末端のシアル酸の除去は、両活性に影響を与えないが、更にガラクトース残基を除去することでCDC活性のみが影響を受け、約50%程度活性が低下すること、糖鎖の完全な除去は、両活性を消失させることを報告した〔モレキュラー・イムノロジー(Molecular Immunol.), 32, 1311 (1995)〕。また、ライフリー(Lifely)らは、CHO細胞、NS0細胞或いはラットミエローマY0細胞で生産したヒト型CDR移植抗体CAMPATH-1H（ヒトIgG1サブクラス）の糖鎖の分析及びADCC活性を測定した結果、Y0細胞由来のCAMPATH-1Hが最も高いADCC活性を示し、その活性にはバイセクティングに位置するN-アセチルグルコサミン（以下、GlcNAcとも表記する）が重要であることを示唆した〔グリコバイオロジー(Glycobiology), 5, 813 (1995) : W099/54342〕。これらの報告は、ヒトIgG1サブクラスの抗体のエフェクター機能に糖鎖の構造が極めて重要な役割を果たしており、糖鎖の構造を変えることでより高いエフェクター機能を有する抗体を作製することが可能であることを示している。しかし、実際には糖鎖の構造は多様かつ複雑であり、エフェクター機能に真に重要な構造を特定できたとはいえない。

糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子を宿主細胞に導入して生産物の糖鎖構造を改変した例としては、ラットの β -ガラクトシド- α -2, 6-シアリルトランスフェラーゼをCHO細胞に導入することで糖鎖の非還元末端にシアル酸が多く付加されたタンパク質の製造が可能であることが報告されている〔ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 261, 13848 (1989)〕。

また、ヒトの β -ガラクトシド-2- α -フコシルトランスフェラーゼをマウスL細胞に導入することで糖鎖の非還元末端にフコース（以下、Fucとも表記する）が付加されたH抗原(Fuc α 1-2Gal β 1-)の発現が確認されている〔サイエンス(Science), 252, 1668, (1991)〕。さらに、ユマナ(Umana)らは、N-グリコシド結合糖鎖のバイセクティングに位置するN-アセチルグルコサミンの付加が抗体のADCC活性に重要であるとの知見に基づき、 β -1, 4-N-アセチルグルコサミン転移酵素III(GnTIII)を発現させたCHO細胞を作製し親株との比較を行っている。親株のCHO細胞ではGnTIIIの発現が観察されておらず〔ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 259, 13370, (1984)〕、作製したGnTIII発現CHO細胞を用いて発現させた抗体は親株で発現させた抗体と比べて高いADCC活性を有していることを確認している

[ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature Biotechnol.), 17, 176 (1999) : W099/54342]。またこの際、ユマナ (Umana) らは、 β -1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnTV) の遺伝子を導入した CHO 細胞も作製しており、GnTIII または GnTV の過剰発現は CHO 細胞に対して毒性を示すことを報告している。RituxanTM に関しては、GnTIII を導入した CHO 細胞を用いて作製した抗体は親株で発現させた抗体と比べて高い ADCC 活性を示すことが報告されているが、その活性差は 10-20 倍程度である [バイオテクノロジー・アンド・バイオエンジニアリング (Biotechnol. Bioeng.), 74, 288 (2001)]。

発明の開示

エフェクター機能の増強された抗 CD20 抗体は治療効果が増大し、投与量の減少による患者の負担の軽減が期待される。また、化学療法や放射性同位元素標識抗体などとの併用の必要性が無くなることによる副作用の低減なども期待される。本発明の目的は、エフェクター機能が増強された抗 CD20 抗体を生産する細胞、およびエフェクター機能が増強された抗 CD20 抗体組成物、該抗体組成物の製造方法、該抗体組成物を含む医薬等を提供することにある。

本発明は、以下の (1) ~ (48) に関する。

(1) CD20 に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 20% 以上である抗体組成物を生産する細胞。

(2) フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの 1 位が N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位に α 結合していない糖鎖である、上記 (1) に記載の細胞。

(3) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失した上記 (1) または (2) に記載の細胞。

(4) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる酵素である、上記 (3) に記載の細胞。

(a) GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase) ;

(b) Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase) ;

(c) GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase)。

(5) GMDが、以下の (a) または (b) であるDNAがコードする蛋白質である、上記 (4) に記載の細胞。

(a) 配列番号41で表される塩基配列からなるDNA；

(b) 配列番号41で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGMD活性を有する蛋白質をコードするDNA。

(6) GMDが、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、上記 (4) に記載の細胞。

(a) 配列番号61で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号61で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGMD活性を有する蛋白質。

(c) 配列番号61で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGMD活性を有する蛋白質。

(7) Fxが、以下の (a) または (b) であるDNAがコードする蛋白質である、上記 (4) に記載の細胞。

(a) 配列番号48で表される塩基配列からなるDNA；

(b) 配列番号48で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつFx活性を有する蛋白質をコードするDNA。

(8) Fxが、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、上記 (4) に記載の細胞。

(a) 配列番号62で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号62で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつFx活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号62で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつFx活性を有する蛋白質。

(9) GFPPが、以下の (a) または (b) であるDNAがコードする蛋白質である、上記 (4) に記載の細胞。

(a) 配列番号51で表される塩基配列からなるDNA；

(b) 配列番号51で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブ

リダイズし、かつGFPP活性を有する蛋白質をコードするDNA。

(10) GFPPが、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、上記 (4) に記載の細胞。

- (a) 配列番号63で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (b) 配列番号63で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGFPP活性を有する蛋白質；
- (c) 配列番号63で表されるアミノ酸配列と 80 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGFPP活性を有する蛋白質。

(11) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が α -1,6-フコシルトランスフェラーゼである、上記 (3) に記載の細胞。

(12) α -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c) 及び (d) からなる群から選ばれるDNAがコードする蛋白質である、上記 (11) に記載の細胞。

- (a) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNA；
- (b) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNA；
- (c) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA；
- (d) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

(13) α -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 及び (f) からなる群から選ばれる蛋白質である、上記 (11) に記載の細胞。

- (a) 配列番号23で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (b) 配列番号24で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (c) 配列番号23で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (d) 配列番号24で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトラ

ンスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(e) 配列番号23で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(f) 配列番号24で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

(14) 酵素の活性が、以下の(a)、(b)、(c)、(d)及び(e)からなる群から選ばれる手法により低下または欠失した、上記(3)～(13)のいずれか1項に記載の細胞。

(a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；

(b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；

(c) 酵素についての突然変異を導入する手法；

(d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法；

(e) N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法。

(15) 少なくともN-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である上記(1)～(14)のいずれか1項に記載の細胞。

(16) 細胞が、下記の(a)～(j)からなる群から選ばれる細胞である、上記(1)～(15)のいずれか1項に記載の細胞。

(a) チャイニーズハムスター卵巢組織由来CHO細胞；

(b) ラットミエローマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞；

(c) マウスミエローマ細胞株NS0細胞；

(d) マウスミエローマ細胞株SP2/0-Ag14細胞；

(e) シリアンハムスター腎臓組織由来BIK細胞；

(f) サルCOS細胞；

(g) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞；

(h) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；

(i) 胚性幹細胞；

(j) 受精卵細胞。

(17) CD20に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-

グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が20%以上である抗体組成物を生産する、該抗体分子をコードする遺伝子を導入したトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(18) フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの1位がN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位に α 結合していない糖鎖である、上記(17)に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(19) 細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下するように、ゲノムが改変された上記(17)または(18)に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(20) 細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の遺伝子またはN-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子がノックアウトされた上記(17)または(18)に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(21) 細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素が、以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選ばれる酵素である、上記(19)または(20)に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

- (a) GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase) ;
- (b) Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase) ;
- (c) GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase) 。

(22) GMDが、以下の(a)または(b)であるDNAがコードする蛋白質である、上記(21)に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

- (a) 配列番号41で表される塩基配列からなるDNA ;
- (b) 配列番号41で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGMD活性を有する蛋白質をコードするDNA。

(23) Fxが、以下の(a)または(b)であるDNAがコードする蛋白質である、

上記（２１）に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) 配列番号48で表される塩基配列からなるDNA；

(b) 配列番号48で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつFx活性を有する蛋白質をコードするDNA。

（２４） GFPPが、以下の（a）または（b）であるDNAがコードする蛋白質である、上記（２１）に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) 配列番号51で表される塩基配列からなるDNA；

(b) 配列番号51で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGFPP活性を有する蛋白質をコードするDNA。

（２５） N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が α -1, 6-フコシルトランスフェラーゼである、上記（１９）または（２０）に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

（２６） α -1, 6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の（a）、（b）、（c）及び（d）からなる群から選ばれるDNAがコードする蛋白質である、上記（２５）に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNA；

(b) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNA；

(c) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1, 6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA；

(d) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1, 6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

（２７） トランスジェニック非ヒト動物が、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル及びウサギからなる群から選ばれる動物である、上記（１７）～（２６）のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

（２８） 抗体分子が、以下の（a）、（b）、（c）及び（d）からなる群から選ばれる分

子である、上記（１）～（１６）のいずれか１項に記載の細胞。

- (a) ヒト抗体；
- (b) ヒト化抗体；
- (c) (a)または(b)のFc領域を含む抗体断片；
- (d) (a)または(b)のFc領域を有する融合蛋白質。

（２９） 抗体分子のクラスがIgGである、上記（１）～（１６）および（２８）のいずれか１項に記載の細胞。

（３０） 抗体分子の軽鎖可変領域の相補性決定領域1、相補性決定領域2、相補性決定領域3が配列番号5、6、7、および／または重鎖可変領域の相補性決定領域1、相補性決定領域2、相補性決定領域3が配列番号8、9、10で示されるアミノ酸配列を含む上記（１）～（１６）、（２８）および（２９）のいずれか１項に記載の細胞。

（３１） 抗体分子の軽鎖可変領域が配列番号12、および／または重鎖可変領域が配列番号14に記載のアミノ酸配列を含む上記（１）～（１６）、（２８）、（２９）および（３０）のいずれかに1項に記載の細胞。

（３２） 抗体分子が、以下の(a)、(b)、(c)及び(d)からなる群から選ばれる分子である、上記（１７）～（２７）のいずれか１項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

- (a) ヒト抗体；
- (b) ヒト化抗体；
- (c) (a)または(b)のFc領域を含む抗体断片；
- (d) (a)または(b)のFc領域を有する融合蛋白質。

（３３） 抗体分子のクラスがIgGである、上記（１７）～（２７）および（３２）のいずれか１項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

（３４） 抗体分子の軽鎖可変領域の相補性決定領域1、相補性決定領域2、相補性決定領域3がそれぞれ配列番号5、6、7、および／または重鎖可変領域の相補性決定領域1、相補性決定領域2、相補性決定領域3がそれぞれ配列番号8、9、10で示されるアミノ酸配列を含む上記（１７）～（２７）、（３２）および（３３）のいずれか１項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

（３５） 抗体分子の軽鎖可変領域が配列番号12、および／または重鎖可変領域が配列番号14に記載のアミノ酸配列を含む上記（１７）～（２７）、（３２）、（

33) および(34)のいずれかに1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(36) 上記(1)～(16)、(28)～(31)のいずれか1項に記載の細胞により生産された抗体組成物。

(37) 上記(17)～(27)、(32)～(35)のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫を飼育し、飼育した動物あるいは植物により生産された抗体組成物。

(38) CD20に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が20%以上である抗体組成物。

(39) フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの1位がN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位に α 結合していない糖鎖である、上記(38)に記載の抗体組成物。

(40) 抗体分子が、以下の(a)、(b)、(c)及び(d)からなる群から選ばれる分子である、上記(38)項に記載の抗体組成物。

- (a) ヒト抗体；
- (b) ヒト化抗体；
- (c) (a)または(b)のFc領域を含む抗体断片；
- (d) (a)または(b)のFc領域を有する融合蛋白質。

(41) 抗体分子のクラスがIgGである、上記(38)～(40)のいずれか1項に記載の抗体組成物。

(42) 抗体分子の軽鎖可変領域の相補性決定領域1、相補性決定領域2、相補性決定領域3がそれぞれ配列番号5、6、7、および／または重鎖可変領域の相補性決定領域1、相補性決定領域2、相補性決定領域3がそれぞれ配列番号8、9、10で示されるアミノ酸配列を含む上記(38)～(41)のいずれか1項に記載の抗体組成物。

(43) 抗体分子の軽鎖可変領域が配列番号12、および／または重鎖可変領域が配列番号14に記載のアミノ酸配列を含む上記(38)～(42)のいずれかに1項に記載の抗体組成物。

(44) 上記(1)～(16)、(28)～(31)のいずれか1項に記載の細胞を培地に培養し、培養物中に上記(36)、(38)～(43)のいずれか1

項に記載の抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物から該抗体組成物を採取する工程を含む、該抗体組成物を製造する方法。

(45) 上記(17)～(27)、(32)～(35)のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫を飼育し、飼育した動物あるいは植物から組織あるいは体液を取得し、取得した組織あるいは体液から上記(36)、(38)～(43)のいずれか1項に記載の抗体組成物を採取する工程を含む、該抗体組成物を製造する方法。

(46) 上記(36)～(43)のいずれか1項に記載の抗体組成物を有効成分として含有する医薬。

(47) 上記(36)～(43)のいずれか1項に記載の抗体組成物を有効成分として含有するCD20関連疾患の治療薬。

(48) CD20関連疾患が、癌または免疫疾患である上記(47)記載の治療薬。

本発明の細胞としては、CD20に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖を有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が20%以上である抗体組成物を生産する細胞であればいかなる細胞も包含される。

本発明において、CD20は、B1やBp35とも呼ばれている約35kDaの細胞表面膜タンパク質で、配列番号4記載のアミノ酸配列で表されたタンパク質または配列番号4で表されるアミノ酸配列の1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつCD20と実質的に同一の性質を有するものであればいかなるものも包含される。

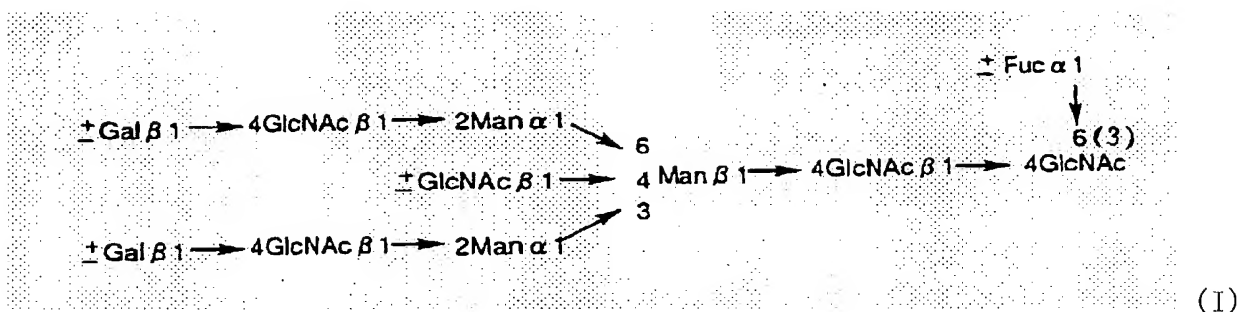
本発明において配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつCD20活性を有する蛋白質は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 (以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997 (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異

導入法を用いて、例えば、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA に部位特異的変異を導入することにより取得することができる。欠失、置換、挿入および／または付加されるアミノ酸の数は 1 個以上でありその数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換、挿入および／または付加できる程度の数であり、例えば、1～数十個、好ましくは 1～20 個、より好ましくは 1～10 個、さらに好ましくは 1～5 個である。

また、本発明において、用いられる蛋白質が、CD20 活性を有するためには、それぞれ配列番号 4 で表されるアミノ酸配列と B L A S T [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] や F A S T A [Methods in Enzymology, 183, 63 (1990)] 等の解析ソフトを用いて計算したときに、少なくとも 80% 以上、好ましくは 85% 以上、より好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは 95% 以上、特に好ましくは 97% 以上、最も好ましくは 99% 以上の相同性を有する。

本発明において、抗体分子の Fc 領域に結合する糖鎖としては、N-グリコシド結合糖鎖が挙げられ、その N-グリコシド結合糖鎖としては、コア構造の非還元末端側にガラクトース-N-アセチルグルコサミン（以下、Gal-GlcNAc と表記する）の枝を並行して 1 ないしは複数本有し、更に Gal-GlcNAc の非還元末端側にシアル酸、バイセクティングの N-アセチルグルコサミンなどの構造を有するコンプレックス型（複合型）糖鎖を挙げることができる。

抗体分子の Fc 領域には、後述する N-グリコシド結合糖鎖がそれぞれ 1 カ所ずつ結合する領域を有しているので、抗体 1 分子あたり 2 本の糖鎖が結合している。抗体に結合する N-グリコシド結合糖鎖としては、下記構造式 (I) で示されるいかなる糖鎖も包含されるので、抗体に結合する 2 本の N-グリコシド結合糖鎖には多数の糖鎖の組み合わせが存在することになる。したがって、Fc 領域に結合した糖鎖構造の観点から物質の同一性を判断することができる。



本発明において、N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる組成物（以下、本発明の抗体組成物と称する）とは、本発明の効果が得られる範囲であれば、単一の糖鎖構造を有する抗体から構成されていてもよいし、複数の異なる糖鎖構造を有する糖鎖から構成されていてもよい。

本発明において、抗体組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合とは、該組成物中に含まれるFc領域に結合する全てのN-グリコシド結合複合型糖鎖の合計数に対して、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の数が占める割合をいう。

本発明において、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖は、該フコースの1位が、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに α 結合していない糖鎖をいう。例えば、該フコースの1位がN-グリコシド結合複合型糖鎖のN-アセチルグルコサミンの6位に α 結合していない糖鎖があげられる。

本発明の抗体組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、好ましくは20%以上、より好ましくは25%以上、さらに好ましくは30%以上、特に好ましくは40%以上、最も好ましくは50%以上があげられ、これらの糖鎖の割合を有する抗体組成物は、高いADCC活性を有する。

抗体濃度が低下すれば、それに伴ってADCC活性が低下するが、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が20%以上の場合、抗体濃度が低くても高いADCC活性を獲得することができる。

N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる組成物中に含まれる、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合は、抗体分子からヒドラジン分解や酵素消化などの公知の方法[生物化学実験法 23—糖タンパク質糖鎖研究法（学会出版センター）高橋禮子編（1989）]を用い、糖鎖を遊離させ、遊離させた糖鎖を蛍光標識又は同位元素標識し、標識した糖鎖をクロマトグラフィー法にて分離することによって決定することができる。また、遊離させた糖鎖をHPAED-PAD法[ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィー (J. Liq. Chromatogr.) , 6, 1577 (1983)]によって分析することによっても決定することができる。

また、本発明の細胞としては、本発明の組成物を生産し、かつ細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失した細胞が包含される。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素としては、細胞内で糖鎖へのフコースの供給源である糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素であればいかなる酵素も包含される。細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に係わる酵素としては、細胞内GDP-フコースの合成に影響を与える酵素を包含する。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に影響を与える酵素としては、上述の細胞内の糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成経路に関与する酵素の活性に影響を与えたり、該酵素の基質となる物質の構造に影響を与える酵素も包含される。

細胞内の糖ヌクレオチドGDP-フコースは、de novoの合成経路あるいはSalvage合成経路により供給されている。したがって、これら合成経路に関与する酵素はすべて細胞内GDP-フコースの合成に関与する酵素に包含される。

細胞内の糖ヌクレオチドGDP-フコースのde novoの合成経路に関与する酵素としては、具体的には、GDP-mannose 4,6-dehydratase (GDP-マンノース4,6-デヒドラターゼ；以下、GMDと表記する)、GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase (GDP-ケト-デオキシマンノース 3,5-エピメラーゼ, 4-リダクターゼ；以下、Fxと表記する) などがあげられる。

細胞内の糖ヌクレオチドGDP-フコースのSalvage合成経路に関与する酵素としては、具体的には、GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase (GDP-ベータ-L-フコース-ピロホスホリラーゼ；以下、GFPPと表記する)、Fucokinase (フコキナーゼ) などがあげられる。

本発明において、GMDとしては、下記(a)または(b)のDNAがコードする蛋白質、(a) 配列番号41で表される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号41で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGMD活性を有する蛋白質をコードするDNA

または、

(c) 配列番号61で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(d) 配列番号61で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGMD活性を有する蛋白質

(e) 配列番号61で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGMD活性を有する蛋白質等があげられる。

また、GMDのアミノ酸配列をコードするDNAとしては、配列番号41で表される塩基配列を有するDNA、配列番号41で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGMD活性を有するアミノ酸配列をコードするDNAなどがあげられる。

本発明において、Fxとしては、下記(a)または(b)のDNAがコードする蛋白質、(a) 配列番号48で表される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号48で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつFx活性を有する蛋白質をコードするDNA

または、

(c) 配列番号62で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(d) 配列番号62で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつFx活性を有する蛋白質

(e) 配列番号62で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつFx活性を有する蛋白質等があげられる。

また、Fxのアミノ酸配列をコードするDNAとしては、配列番号48で表される塩基配列を有するDNA、配列番号48で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつFx活性を有するアミノ酸配列をコードするDNAなどがあげられる。

本発明において、GFPPとしては下記(a)または(b)のDNAがコードする蛋白質、

(a) 配列番号51で表される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号51で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGFPP活性を有する蛋白質をコードするDNA

または、

(c) 配列番号63で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(d) 配列番号63で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGFPP活性を有する蛋白質

(e) 配列番号63で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGFPP活性を有する蛋白質等があげられる。

また、GFPPのアミノ酸配列をコードするDNAとしては、配列番号51で表される塩基配列を有するDNA、配列番号51で表される塩基配列を有するDNAとストリンジेंटな条件でハイブリダイズし、かつGFPP活性を有するアミノ酸配列をコードするDNAなどがあげられる。

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素とは、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合する反応に関与する酵素であればいかなる酵素も包含される。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合する反応に関与する酵素とは、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合する反応に影響を与える酵素をいう。

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する反応に関与する酵素としては、具体的には、 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼや α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

また、上述のN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合する反応に関与する酵素の活性に影響を与えたり、該酵素の基質となる物質の構造に影響を与える酵素も包含される。

本発明において、 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼとしては、下記(a)、(b)、(c)または(d)のDNAがコードする蛋白質、

(a) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNA

(c) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNAとストリンジेंटな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA

(d) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNAとストリンジेंटな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA

または、

(e) 配列番号23で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(f) 配列番号24で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(g) 配列番号23で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、

挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(h) 配列番号24で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(i) 配列番号23で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(j) 配列番号24で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質
等があげられる。

また、 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列をコードするDNAとしては、配列番号1または2で表される塩基配列を有するDNA、配列番号1または2で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNAなどがあげられる。

本発明において、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、例えば配列番号1、2、48、51または41で表される塩基配列からなるDNAなどのDNAまたはその一部の断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0Mの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジ、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号1、2、48、51または41で表される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましく

は 95%以上、最も好ましくは 98%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

本発明において、配列番号 23、24、61、62または63で表されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性、GMD活性、Fx活性またはGFPP活性を有する蛋白質は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば、配列番号1、2、41、48または51で表される塩基配列を有するDNAに部位特異的変異を導入することにより取得することができる。欠失、置換、挿入および／または付加されるアミノ酸の数は1個以上でありその数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、例えば、1～数十個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個である。

また、本発明において、用いられる蛋白質が、 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性、GMD活性、Fx活性またはGFPP活性を有するためには、それぞれ配列番号23、24、61、62または63で表されるアミノ酸配列とBLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] やFASTA [Methods in Enzymology, 183, 63 (1990)] 等の解析ソフトを用いて計算したときに、少なくとも80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上、最も好ましくは99%以上の相同性を有する。

また、本発明の細胞、すなわち、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失した細胞を取得する方法としては、目的とする酵素活性を低下させることができる手法であれば、いずれの手法でも用いることができる。上述の酵素活性を低下または欠失させる手法としては、

- (a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；
- (b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；

- (c) 酵素についての突然変異を導入する手法；
- (d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法；
- (e) N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法などがあげられる。

N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンとしては、該糖鎖構造を認識できるレクチンであれば、いずれのレクチンでも用いることができる。その具体的な例としては、レンズマメレクチンLCA (Lens Culinaris由来のLentil Agglutinin)、エンドウマメレクチンPSA (Pisum sativum由来のPea Lectin)、ソラマメレクチンVFA (Vicia faba由来のAgglutinin)、ヒイロチャワンタケレクチンAAL (Aleuria aurantia由来のLectin)等を挙げることができる。

本発明の抗体組成物を生産させる宿主細胞としては、抗CD20抗体分子を発現できる宿主細胞すなわち抗CD20抗体分子をコードする遺伝子を組み込んだ宿主細胞であればいかなる細胞も包含する。その例として、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞などがあげられる。これらの細胞としては、後述1に記載のものがあげられ、特に、動物細胞の中でも、チャイニーズハムスター卵巢組織由来のCHO細胞、ラットミエローマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞、マウスミエローマ細胞株NS0細胞、マウスミエローマ細胞株SP2/0-Ag14細胞、シリアンハムスター腎臓組織由来BHK細胞、抗体を産生するハイブリドーマ細胞、ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞などが好ましい。具体的には、本発明の抗CD20抗体の遺伝子を組み込んだラットミエローマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞形質転換クローンKM3065 (FERM BP-7834)があげられる。

本発明のヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫としては、CD20に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が20%以上である抗体組成物を生産する、該抗体分子をコードする遺伝子を導入したトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫であればいかなるものも包含される。具体的には、マウスES細胞へCD20に特異的に結合する抗体の遺伝子を導入し、該ES細胞を他のマウスの初期

胚へ移植後、発生させることにより該抗体産生トランスジェニック動物を作製することができる。また、動物の受精卵にCD20に特異的に結合する抗体の遺伝子を導入し、該受精卵を発生させることによって該抗体産生トランスジェニック動物を作製することもできる。

トランスジェニック非ヒト動物は、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル又はウサギ等があげられる。

本発明において、抗体分子としては、抗体のFc領域を含む分子であればいかなる分子も包含されるが、抗体、抗体の断片、Fc領域を含む融合タンパク質などがあげられる。

抗体とは、外来抗原刺激の結果、免疫反応によって生体内に産生される蛋白質で、抗原と特異的に結合する活性を有するものをいう。抗体としては動物に抗原を免疫し、免疫動物の脾臓細胞より作製したハイブリドーマ細胞が分泌する抗体のほか、遺伝子組換え技術により作製された抗体、すなわち、抗体遺伝子を挿入した抗体発現ベクターを、宿主細胞へ導入することにより取得された抗体などがあげられる。具体的には、ハイブリドーマが生産する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体などをあげることができる。

ハイブリドーマとしては、ヒト以外の哺乳動物に抗原を免疫して取得されたB細胞と、マウス等に由来するミエローマ細胞とを細胞融合させて得られる、所望の抗原特異性を有したモノクローナル抗体を産生する細胞があげられる。

ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型相補性決定領域（以下、相補性決定領域をCDRとも称す）移植抗体などがあげられる。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体重鎖可変領域（以下、可変領域はV領域、重鎖はH鎖としてHVまたはVHとも称す）および抗体軽鎖可変領域（以下、軽鎖はL鎖としてLVまたはVLとも称す）とヒト抗体の重鎖定常領域（以下、CHとも称す）およびヒト抗体の軽鎖定常領域（以下、CLとも称す）とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

ヒト型キメラ抗体は、モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体CHおよびヒト抗体CLをコードする遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、宿主細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

ヒト型キメラ抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン（以下、hIgと表記する）に属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、更にhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のCLとしては、hIgに属すればいかなるものでもよく、 κ クラスあるいは λ クラスのものを用いることができる。

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列をヒト抗体のVHおよびVLの適切な位置に移植した抗体を意味する。

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDR配列を任意のヒト抗体のVHおよびVLのCDR配列に移植したV領域をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびヒト抗体のCLをコードする遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入することによりヒト型CDR移植抗体を発現させ、製造することができる。

ヒト型CDR移植抗体のCHとしては、hIgに属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、更にhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型CDR移植抗体のCLとしては、hIgに属すればいかなるものでもよく、 κ クラスあるいは λ クラスのものを用いることができる。

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体を意味するが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーならびにヒト抗体産生トランスジェニック動物あるいはヒト抗体産生トランスジェニック植物から得られる抗体等も含まれる。

ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、EBウイルス等を感染させ不死化、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養物中より該抗体を精製することができる。

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトB細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することによりFab (Fragment of antigen binding)、一本鎖抗体等の抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、2本の完全なH鎖および2本の完全なL鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

抗体の断片とは、上記抗体のFc領域を含んだ断片を意味する。抗体の断片としては、H鎖の単量体、H鎖の2量体などがあげられる。

Fc領域を含む融合タンパク質としては、抗体のFc領域を含んだ抗体あるいは抗体の断片と、酵素、サイトカインなどのタンパク質とを融合させた物質を包含する。

本発明の抗体分子としては、CD20に特異的に結合する抗体分子であればいかなるものでもよいが、好ましくは軽鎖可変領域の相補性決定領域1、相補性決定領域2、相補性決定領域3がそれぞれ配列番号5、6、7、および／または重鎖可変領域の相補性決定領域1、相補性決定領域2、相補性決定領域3がそれぞれ配列番号8、9、10で示されるアミノ酸配列を含む、CD20に特異的に結合する抗体分子、より好ましくは軽鎖可変領域が配列番号12、および／または重鎖可変領域が配列番号14に記載のアミノ酸配列を含む、CD20に特異的に結合する抗体分子などがあげられる。

本発明の医薬としては、上述した本発明の抗体組成物、すなわち抗CD20抗体分子の組成物を有効成分として包含する医薬があげられる。

CD20関連疾患としては、B細胞リンパ腫などの癌、炎症性疾患、自己免疫疾患などの免疫疾患などがあげられる。

本発明において、ADCC活性とは、生体内で、腫瘍細胞等の細胞表面抗原などに結合した抗体が、抗体Fc領域とエフェクター細胞表面上に存在するFcレセプターとの結合を介してエフェクター細胞を活性化し、腫瘍細胞等を傷害する活性を意味する [モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルス・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., Chapter 2.1 (1995)]。エフェクター細胞としては、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、活性化されたマクロファージ等があげられる。

以下、本発明を詳細に説明する。

1. 本発明の抗体組成物を生産する細胞の作製

本発明の細胞は、以下に述べる手法により、本発明の抗体組成物を生産するために用いる宿主細胞を作製し、該宿主細胞に後述3に述べる方法により、抗CD20抗体をコードする遺伝子を導入することにより、作製することができる。

(1) 酵素の遺伝子を標的とした遺伝子破壊の手法

本発明の細胞の作製のために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺

伝子を標的とし、遺伝子破壊の方法を用いることにより作製することができる。細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、Fx、GFPP、Fucokinaseなどがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

ここでいう遺伝子とは、DNAまたはRNAを含む。

遺伝子破壊の方法としては、標的とする酵素の遺伝子を破壊することができる方法であればいかなる方法も包含される。その例としては、アンチセンス法、リボザイム法、相同組換え法、RNA-DNA オリゴヌクレオチド法（以下、RDO法と表記する）、RNAインターフェイス法（以下、RNAi法と表記する）、レトロウイルスを用いた方法、トランスポゾンを用いた方法等があげられる。以下これらを具体的に説明する。

（a）アンチセンス法又はリボザイム法による本発明の細胞を作製するための宿主細胞の作製

本発明の細胞の作製のために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素遺伝子を標的とし、細胞工学, 12, 239 (1993)、バイオ／テクノロジー (BIO/TECHNOLOGY), 17, 1097 (1999)、ヒューマン・モレキュラー・ジェネティクス (Hum. Mol. Genet.), 5, 1083 (1995)、細胞工学, 13, 255 (1994)、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 96, 1886 (1999)等に記載されたアンチセンス法またはリボザイム法を用いて、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするcDNAあるいはゲノムDNAを調製する。

調製したcDNAあるいはゲノムDNAの塩基配列を決定する。

決定したDNAの配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするDNA部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さのアンチセンス遺伝子ま

たはリボザイムのコンストラクトを設計する。

該アンチセンス遺伝子、またはリボザイムを細胞内で発現させるために、調製したDNAの断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の細胞を得ることができる。また、細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造または産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の細胞の作製のために用いる宿主細胞を得ることもできる。

本発明の細胞を作製するために用いられる宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述3に記載の宿主細胞があげられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組み込みが可能で、設計したアンチセンス遺伝子、またはリボザイムを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述3に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入方法としては、後述3に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、以下の方法があげられる。

形質転換体を選択する方法

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が

α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失した細胞を選択する方法としては、文献[新生化学実験講座 3—糖質 I, 糖タンパク質(東京化学同人)日本生化学会編(1988)]、文献[細胞工学, 別冊, 実験プロトコールシリーズ, グライコバイオロジー実験プロトコール, 糖タンパク質・糖脂質・プロテオグリカン(秀潤社製)谷口直之・鈴木明美・古川清・菅原一幸監修(1996)]、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された生化学的な方法あるいは遺伝子工学的な方法などがあげられる。生化学的な方法としては、例えば、酵素特異的な基質を用いて酵素活性を評価する方法があげられる。遺伝子工学的な方法としては、例えば、酵素遺伝子のmRNA量を測定するノーザン解析やRT-PCR法等があげられる。

細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述1の(5)に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述4または後述5に記載の方法があげられる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするcDNAを調製する方法としては、例えば、下記に記載の方法があげられる。

DNAの調製方法

各種宿主細胞の組織又は細胞から全RNA又はmRNAを調製する。

調製した全RNA又はmRNAからcDNAライブラリーを作製する。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のアミノ酸配列に基づいて、デジェネレイティブプライマーを作製し、作製したcDNAライブラリーを鋳型としてPCR法で細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得する。

取得した遺伝子断片をプローブとして用い、cDNAライブラリーをスクリーニングし、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結

合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするDNAを取得することができる。

ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞のmRNAは市販のもの(例えばClontech社)を用いてもよいし、以下のごとくヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞から調製してもよい。ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法 [メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 154, 3 (1987)]、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム (AGPC) 法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 162, 156 (1987); 実験医学, 9, 1937 (1991)] などがあげられる。

また、全RNAから poly (A)⁺ RNAとしてmRNAを調製する方法としては、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 (モレキュラー・クローニング第2版) 等があげられる。

さらに、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社) などのキットを用いることによりmRNAを調製することができる。

調製したヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞mRNAからcDNAライブラリーを作製する。cDNAライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、A Laboratory Manual, 2nd Ed. (1989)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばSuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (Life Technologies社)、ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE社)を用いる方法などがあげられる。

cDNAライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express [STRATAGENE社、ストラテジーズ (Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、Lambda ZAP II (STRATAGENE社)、λgt10、λgt11 [ディーエヌエー・クローニング・ア・プラクティカル・アプローチ (DNA cloning, A Practical Approach), 1, 49 (1985)]、λTriplEx (Clontech社)、λExCell (Pharmacia社)、pT7T318U (Pharmacia社)、pcD2 [モレキュラー・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] およびpUC18 [ジーン (Gene), 33, 103 (1985)] 等をあげることができる。

宿主微生物としては、微生物であればいずれでも用いることができるが、好ましくは大腸菌が用いられる。具体的には、*Escherichia coli* XL1-Blue MRF' [STRATAGENE 社、ストラテジーズ(Strategies), 5, 81 (1992)]、*Escherichia coli* C600 [ジェネティクス(Genetics), 39, 440 (1954)]、*Escherichia coli* Y1088 [サイエンス(Science), 222, 778 (1983)]、*Escherichia coli* Y1090 [サイエンス(Science), 222, 778 (1983)]、*Escherichia coli* NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、*Escherichia coli* K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] および *Escherichia coli* JM105 [ジーン(Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

このcDNAライブラリーを、そのまま以降の解析に用いてもよいが、不完全長cDNAの割合を下げ、なるべく完全長cDNAを効率よく取得するために、菅野らが開発したオリゴキャップ法 [ジーン(Gene), 138, 171 (1994); ジーン(Gene), 200, 149 (1997); 蛋白質核酸酵素, 41, 603 (1996); 実験医学, 11, 2491 (1993); cDNAクローニング(羊土社)(1996); 遺伝子ライブラリーの作製法(羊土社)(1994)] を用いて調製したcDNAライブラリーを以下の解析に用いてもよい。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のアミノ酸配列に基づいて、該アミノ酸配列をコードすることが予測される塩基配列の5'末端および3'末端の塩基配列に特異的なデジェネレイティブプライマーを作製し、作製したcDNAライブラリーを鋳型としてPCR法 [ピーシーアール・プロトコールズ(PCR Protocols), Academic Press (1990)] を用いてDNAの増幅を行うことにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得することができる。

取得した遺伝子断片が細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするDNAであることは、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.), 74, 5463 (1977)] あるいはABI PRISM 377 DNAシー

クエンサー (Applied Biosystems社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

該遺伝子断片DNAをプローブとして、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞に含まれるmRNAから合成したcDNAあるいはcDNAライブラリーに対してコロニーハイブリダイゼーションやブランクハイブリダイゼーション (モレキュラー・クローニング第2版) を行うことにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のDNAを取得することができる。

また、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得するために用いたプライマーを用い、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞に含まれるmRNAから合成したcDNAあるいはcDNAライブラリーを鋳型として、PCR法を用いてスクリーニングを行うことにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のDNAを取得することもできる。

取得した細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするDNAの塩基配列を末端から、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいはABI PRISM 377 DNAシーケンサー (Applied Biosystems社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該DNAの塩基配列を決定する。

決定したcDNAの塩基配列をもとに、BLAST等の相同性検索プログラムを用いて、GenBank、EMBLおよびDDBJなどの塩基配列データベースを検索することにより、データベース中の遺伝子の中で細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードしている遺伝子を決定することもできる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素

をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号48、51または41に記載の塩基配列があげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号1または2に記載の塩基配列があげられる。

決定されたDNAの塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社のDNA合成機model 392等のDNA合成機で化学合成することにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAを取得することもできる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを調製する方法としては、例えば、以下に記載の方法があげられる。

ゲノムDNAの調製方法

ゲノムDNAを調製する方法としては、モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された公知の方法があげられる。また、ゲノムDNAライブラリースクリーニングシステム（Genome Systems社）やUniversal GenomeWalker™ Kits（CLONTECH社）などを用いることにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを単離することもできる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素のゲノムDNAの塩基配列として、例えば配列番号57または60に記載の塩基配列があげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAの塩基配列として、例えば配列番号3に記載の塩基配列があげられる。

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の塩基配列に基づいて設計したアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムを、直接宿主細胞に導

入することで、本発明の宿主細胞を得ることもできる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムは、常法またはDNA合成機を用いることにより調製することができる。具体的には、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするcDNAおよびゲノムDNAの塩基配列のうち、連続した5～150塩基、好ましくは5～60塩基、より好ましくは10～40塩基に相当する配列を有するオリゴヌクレオチドの配列情報に基づき、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチド）または該オリゴヌクレオチドの配列を含むリボザイムを合成することで調製することができる。

オリゴヌクレオチドとしては、オリゴRNAおよび該オリゴヌクレオチドの誘導体（以下、オリゴヌクレオチド誘導体という）等があげられる。

オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN 3'-P 5'ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン（phenoxazine-modified cytosine）で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等があげられる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

（b）相同組換え法による本発明細胞の作製のために用いる宿主細胞の作製

本発明の細胞の作製のために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、染色体上の標的遺伝子を相同組換え法を用い改変することによっ

て作製することができる。

染色体上の標的遺伝子の改変は、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) (以下、「マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル」と略す)、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995) (以下、「ES細胞を用いた変異マウスの作製」と略す) 等に記載の方法を用い、例えば以下のように行うことができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを調製する。

ゲノムDNAの塩基配列にも基づき、改変する標的遺伝子 (例えば、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の構造遺伝子、あるいはプロモーター遺伝子) を相同組換えするためのターゲットベクターを作製する。

作製したターゲットベクターを宿主細胞に導入し、標的遺伝子とターゲットベクターの間で相同組換えを起こした細胞を選択することにより、本発明の細胞の作製のために用いる宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述3に記載の宿主細胞があげられる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを調製する方法としては、上記1の(1)の(a)に記載のゲノムDNAの調製方法などがあげられる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素のゲノムDNAの塩基配列として、例えば配列番号57または60に記載の塩基配列があげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位に

フコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAの塩基配列として、例えば配列番号3に記載の塩基配列があげられる。

標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターは、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング, E S細胞を用いた変異マウスの作製(羊土社)(1995)等に記載の方法にしたがって作製することができる。ターゲットベクターは、リプレースメント型、インサクション型いずれでも用いることができる。

各種宿主細胞へのターゲットベクターの導入には、後述3に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング, E S細胞を用いた変異マウスの作製(羊土社)(1995)等に記載のポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリA選択などの方法を用いることができる。選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノムDNAに対するサザンハイブリダイゼーション法(モレキュラー・クローニング第2版)やPCR法[ピーシーアール・プロトコールズ(PCR Protocols), Academic Press (1990)]等があげられる。

(c) RDO方法による本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞の作製

本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、RDO法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAあるいはゲノムDNAを調製する。

調製したcDNAあるいはゲノムDNAの塩基配列を決定する。

決定したDNAの配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さのRDOのコンストラクトを設計し合成する。

合成したRDOを宿主細胞に導入し、標的とした酵素、すなわち細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素に変異が生じた形質転換体を選択することにより、本発明の宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述3に記載の宿主細胞があげられる。

各種宿主細胞へのRDOの導入には、後述3に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAを調製する方法としては、例えば、上記1の(1)の(a)に記載の「DNAの調製方法」などがあげられる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを調製する方法としては、例えば、上記1の(1)の(a)に記載のゲノムDNAの調製方法などがあげられる。

DNAの塩基配列は、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene社製)等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.), 74, 5463 (1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、A. L. F. DNAシーケンサー (Pharmacia社製) 等を用いて解析することで該DNAの塩基配列を決定することができる。

RDOは、常法またはDNA合成機を用いることにより調製することができる。

RDOを宿主細胞に導入し、標的とした酵素、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子に

変異が生じた細胞を選択する方法としては、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された染色体上の遺伝子の変異を直接検出する方法があげられる。

また、前記1の(1)の(a)に記載の、導入した細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法、後述1の(5)に記載の細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法、あるいは、後述4または後述5に記載の産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法も用いることができる。

RDOのコンストラクトは、サイエンス(Science), 273, 1386 (1996); ネイチャー・メディシン(Nature Medicine), 4, 285 (1998); ヘパトロジー(Hepatology), 25, 1462 (1997); ジーン・セラピー(Gene Therapy), 5, 1960 (1999); ジーン・セラピー(Gene Therapy), 5, 1960 (1999); ジャーナル・オブ・モレキュラー・メディシン(J. Mol. Med.), 75, 829 (1997); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 8774 (1999); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 8768 (1999); ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nuc. Acids. Res.), 27, 1323 (1999); インベスティゲーション・オブ・ダーマトロジー(Invest. Dermatol.), 111, 1172 (1998); ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 16, 1343 (1998); ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 18, 43 (2000); ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 18, 555 (2000)等の記載に従って設計することができる。

(d) RNAi法による本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞の作製

本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、RNAi法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAを調製する。

調製したcDNAの塩基配列を決定する。

決定したDNAの配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする部分あるいは非翻訳領域の部分を含む適当な長さのRNAi遺伝子のコンストラクトを設計する。

該RNAi遺伝子を細胞内で発現させるために、調製したDNAの断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

導入した細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞表面上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を得ることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述3に記載の宿主細胞があげられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組み込みが可能で、設計したRNAi遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述3に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述3に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、本項1の(1)の(a)に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法とし

ては、例えば、本項 1 の (5) に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述 4 または後述 5 に記載の方法があげられる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAを調製する方法としては、例えば、本項 1 の (1) の (a) に記載された「DNAの調製方法」などがあげられる。

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の塩基配列に基づいて設計したRNAi遺伝子を、直接宿主細胞に導入することで、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を得ることもできる。

RNAi遺伝子は、常法またはDNA合成機を用いることにより調製することができる。

RNAi遺伝子のコンストラクトは、[ネイチャー(Nature), 391, 806 (1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 95, 15502 (1998); ネイチャー(Nature), 395, 854 (1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 5049 (1999); セル(Cell), 95, 1017 (1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 1451 (1999); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 95, 13959 (1998); ネイチャー・セル・バイオロジー(Nature Cell Biol.), 2, 70 (2000)]等の記載に従って設計することができる。

(e) トランスポゾンを用いた方法による、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞の作製

本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞は、ネイチャー・ジェネティク(Nature Genet.), 25, 35 (2000)等に記載のトランスポゾンのシステムを用い、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標に突然変異体を選択することで、本発明の細胞を作製

するために用いる宿主細胞を作製することができる。

トランスポゾンのシステムとは、外来遺伝子をランダムに染色体上に挿入させることで突然変異を誘発させるシステムであり、通常、トランスポゾンに挿まれた外来遺伝子を突然変異を誘発させるベクターとして用い、この遺伝子を染色体上にランダムに挿入させるためのトランスポゼースの発現ベクターを同時に細胞の中に導入する。

トランスポゼースは、用いるトランスポゾンの配列に適したものであればいかなるものも用いることができる。

外来遺伝子としては、宿主細胞のDNAに変異を誘起するものであればいかなる遺伝子も用いることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述3に記載の宿主細胞があげられる。各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述3に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、本項1の(1)の(a)に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、本項1の(5)に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、後述4または後述5に記載の方法があげられる。

(2) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法

本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、該酵素のドミナントネガティブ体を導入する手法を用いることにより作製することができる。細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与す

る酵素としては、具体的には、GMD、Fx、GFPP、Fucokinaseなどがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

これらの酵素は、基質特異性を有したある特定の反応を触媒する酵素であり、このような基質特異性を有した触媒作用を有する酵素の活性中心を破壊することで、これらの酵素のドミナントネガティブ体を作製することができる。標的とする酵素のうち、GMDを例として、そのドミナントネガティブ体に作製について具体的に以下に述べる。

大腸菌由来のGMDの立体構造を解析した結果、4つのアミノ酸（133番目のトレオニン、135番目のグルタミン酸、157番目のチロシン、161番目のリシン）が酵素活性に重要な機能を担っていることが明らかにされている（Structure, 8, 2, 2000）。すなわち、立体構造の情報にもとづきこれら4つのアミノ酸を異なる他のアミノ酸に置換した変異体を作製した結果、いずれの変異体においても有意に酵素活性が低下していたことが示されている。一方、GMDの補酵素NADPや基質であるGDP-マンノースとの結合能に関しては、いずれの変異体においてもほとんど変化が観察されていない。従って、GMDの酵素活性を担うこれら4つのアミノ酸を置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。大腸菌由来のGMDの結果に基づき、アミノ酸配列情報をもとにした相同性比較や立体構造予測を行うことにより、例えば、CHO細胞由来のGMD（配列番号41）では、155番目のトレオニン、157番目のグルタミン酸、179番目のチロシン、183番目のリシンを他のアミノ酸に置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。このようなアミノ酸置換を導入した遺伝子の作製は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された部位特異的変異導入法を用いて行うことができる。

本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞は、上述のように作製した標的酵素のドミナントネガティブ体遺伝子を用い、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第2版等に記載された遺伝子導入の方法に従って、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結

合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のドミナントネガティブ体をコードする遺伝子（以下、ドミナントネガティブ体遺伝子と略記する）を調製する。

調製したドミナントネガティブ体遺伝子の全長DNAをもとにして、必要に応じて、該タンパク質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。

該DNA断片、または全長DNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、形質転換体を得る。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述3に記載の宿主細胞があげられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組み込みが可能で、目的とするドミナントネガティブ体をコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述3に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述3に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述1（1）の（a）に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述1の（5）に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構

造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述 4 または後述 5 に記載の方法があげられる。

(3) 酵素についての突然変異を導入する手法

本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子について突然変異を導入し、該酵素に突然変異を生じた所望の細胞株を選択する手法を用いることにより作製できる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、Fx、GFPP、Fucokinaseなどがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 α -1, 6-フコシルトランスフェラーゼ、 α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

方法としては、1) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として所望の細胞株を選択する方法、2) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、生産抗体分子の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法、3) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、該細胞の細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法などがあげられる。

突然変異誘発処理としては、親株の細胞のDNAに点突然変異、欠失あるいはフレームシフト突然変異を誘起するものであればいかなる処理も用いることができる。

具体的には、エチルニトロソウレア、ニトロソグアニジン、ベンゾピレン、アクリジン色素による処理、放射線の照射などがあげられる。また、種々のアルキル化剤や発癌物質も突然変異誘発物質として用いることができる。突然変異誘発物質を細胞に作用させる方法としては、例えば、組織培養の技術 第三版 (朝倉書店) 日本組織培養学会編(1996)、ネイチャー・ジェネティクス(Nature Genet.), 24, 314, (2000)等に記載の方法を挙げることができる。

自然発生的に生じた突然変異体としては、特別な突然変異誘発処理を施さないで、

通常の細胞培養の条件で継代培養を続けることによって自然発生的に生じる突然変異体を挙げるができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を測定する方法としては、例えば、本項1の(1)の(a)に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、後述4または後述5に記載の方法があげられる。細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、本項の1の(5)に記載の方法があげられる。

(4) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法

本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、アンチセンスRNA/DNA技術 [バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992)、化学, 46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学, 16, 1463 (1997)]、トリプル・ヘリックス技術 [Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)] 等を用い、標的とする遺伝子の転写または翻訳を抑制することで作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、Fx、GFPP、Fucokinaseなどがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

(5) N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法

本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞は、N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法を用いることにより作製することができる。

N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1

位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法としては、例えば、ソマティック・セル・アンド・モレキュラー・ジェネティクス (Somatic Cell Mol. Genet.) , 12, 51 (1986)等に記載のレクチンを用いた方法があげられる。

レクチンとしては、N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンであればいずれのレクチンでも用いることができるが、その具体的な例としては、レンズマメレクチンLCA (Lens Culinaris由来のLentil Agglutinin) エンドウマメレクチンPSA (Pisum sativum由来のPea Lectin) 、ソラマメレクチンVFA (Vicia faba由来のAgglutinin) 、ヒイロチャワンタケレクチンAAL (Aleuria aurantia由来のLectin) 等を挙げるることができる。

具体的には、1 μ g/ml～1 mg/mlの濃度の上述のレクチンを含む培地で1日～2週間、好ましくは1日～1週間培養し、生存している細胞を継代培養あるいはコロニーをピックアップし別の培養器に移し、さらに引き続きレクチンを含む培地で培養を続けることによって、本発明のN-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択することができる。

2. 本発明のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物またはそれら子孫の作製

本発明の抗体分子の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が制御されるようにゲノム遺伝子が改変されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物またはそれら子孫は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的として、前記1を用いて作製した本発明の胚性幹細胞、受精卵細胞、植物カルス細胞より、例えば以下のように作製することができる。

トランスジェニック非ヒト動物の場合、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル、ウサギ等の胚性幹細胞に、前記1.に記載の手法を用いることにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が制御された本発明の胚性幹細胞を作製することができる。

具体的は、染色体上の細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子を公知の相同組換えの手法〔例えば、Nature, 326, 6110, 295 (1987)、Cell, 51, 3, 503 (1987)等〕により不活化または任意の配列と置換した変異クローンを作成する。作製した胚性幹細胞（例えば、該変異クローン）を用い、動物の受精卵の胚盤胞 (blastocyst) への注入キメラ法または集合キメラ法等の手法により、胚性幹細胞クローンと正常細胞からなるキメラ個体を調製することができる。このキメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞で細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下したトランスジェニック非ヒト動物を得ることができる。

また、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル、ウサギ等の受精卵細胞に、前記1. に記載の手法と同様の手法を用いることにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下した本発明の受精卵細胞を作製することができる。

作製した受精卵細胞を、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第2版等に記載の胚移植の方法を用いて偽妊娠雌の卵管あるいは子宮に移植し出産させることで、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下したトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。

トランスジェニック植物の場合、目的とする植物体カルス又は細胞に、前記1. に記載の手法と同様の手法を用いることにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下した本発明のカルスを作製することができる。

作製したカルスを、公知の方法〔組織培養, 20 (1994); 組織培養, 21 (1995); トレンズ・イン・バイオテクノロジー (Trends in Biotechnology), 15, 45 (1997)]に準

じてオーキシシン及びサイトカイニンを含む培地で培養することで再分化させ、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下したトランスジェニック植物を作製することができる。

3. 抗体組成物の製造方法

抗体組成物は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988（以下、アンチボディズと略す）、Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press, 1993（以下、モノクローナルアンチボディズと略す）、Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1996（以下、アンチボディエンジニアリングと略す）等に記載された方法を用い、例えば、以下のように宿主細胞中で発現させて取得することができる。

本発明の抗CD20抗体分子の全長cDNAを調製し、該抗体分子をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。

該DNA断片、または全長cDNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、抗体分子を生産する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

抗体分子のFc領域に結合するN-グリコシド結合糖鎖の修飾に係わる酵素、すなわち細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失した細胞を選択するか、または前述1に示された種々の人為的手法により得られた細胞を宿主細胞として用いることもできる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、目的とする抗体分子をコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

cDNAは、前記1.の(1)の(a)に記載のDNAの調製方法に従い、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞より、目的とする抗体分子に特異的なプローブプライマー等を用いて調製することができる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)等をあげることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF α 1プロモーター、CUP1プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クリュイベロミセス属、トリコスポロン属、シュワニオミセス属等に属する微生物、例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Kluyveromyces lactis*、*Trichosporon pullulans*、*Schwanniomyces alluvius*等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods. Enzymol.), 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A), 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (J. Bacteriology), 153, 163 (1983)]、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A), 75, 1929 (1978)に記載の方法等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNAI、pcDM8 (フナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平3-22979; サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133, (1990)]、pAS3-3 [特開平2-227075]、pCDM8 [ネイチャー (Nature), 329, 840, (1987)]、pcDNAI/Amp (Invitrogen社)、pREP4 (Invitrogen社)、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochemistry), 101, 1307 (1987)]、pAGE210等をあげることができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタ

ロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299)、ラットミエローマ細胞、マウスミエローマ細胞、シリアンハムスター腎臓由来細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 [特開平2-227075]、リポフェクション法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)]、インジェクション法 [マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 [特許第2606856、特許第2517813]、DEAE-デキストラン法 [バイオマニュアルシリーズ4—遺伝子導入と発現・解析法 (羊土社) 横田崇・新井賢一編(1994)]、ウイルスベクター法 [マニピュレイティング・マウス・エンブリオ第2版]等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、タンパク質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにInvitrogen社) 等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21 [カレント

・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、Trichoplusia niの卵巣細胞であるHigh 5 (Invitrogen社) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (Agrobacterium) を用いる方法 [特開昭59-140885、特開昭60-70080、W094/00977]、エレクトロポレーション法 [特開昭60-251887]、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法 [日本特許第2606856、日本特許第2517813] 等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、Fc領域と他のタンパク質との融合タンパク質発現等を行うことができる。

糖鎖の合成に関与する遺伝子を導入した細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞により発現させた場合には、導入した遺伝子によって糖あるいは糖鎖が付加された抗体分子を得ることができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に抗体分子を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、抗体組成物を製造することができる。形質転換体を培地に培養する方法は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体

を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中のpHは3.0～9.0に保持する。pHの調製は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また、培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地 [ザ・ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association), 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [サイエンス (Science), 122, 501 (1952)]、ダルベッコ

改変MEM培地〔ヴェウロロジー(Virology), 8, 396 (1959)〕、199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォア・ザ・バイオロジカル・メディシン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73, 1 (1950)〕、Whitten培地〔発生工学実験マニュアルトランスジェニック・マウスの作り方(講談社)勝木元也編(1987)〕またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH 6～8、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地(Pharmingen社)、Sf-900 II SFM培地(Life Technologies社)、ExCell400、ExCell405(いずれもJRH Biosciences社)、Grace's Insect Medium〔ネイチャー(Nature), 195, 788 (1962)〕等を用いることができる。

培養は、通常pH 6～7、25～30℃等の条件下で、1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スークグ(MS)培地、ホワイト(White)培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH 5～9、20～40℃の条件下で3～60日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記のとおり、抗体分子をコードするDNAを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。

抗体遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法に準じて、分泌生産、融合タンパク質発現等を行うこと

ができる。

抗体組成物の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させる抗体分子の構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

抗体組成物が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 86, 8227 (1989); ジーン・デベロップメント (Genes Develop.), 4, 1288 (1990)]、または特開平05-336963、特開平06-823021等に記載の方法を準用することにより、該抗体組成物を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、発現ベクターに、抗体分子をコードするDNA、および抗体分子の発現に適切なシグナルペプチドをコードするDNAを挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入の後に抗体分子を発現させることにより、目的とする抗体分子を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体（トランスジェニック非ヒト動物）または植物個体（トランスジェニック植物）を造成し、これらの個体を用いて抗体組成物を製造することもできる。

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、抗体組成物を生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該抗体組成物を採取することにより、該抗体組成物を製造することができる。

動物個体を用いて抗体組成物を製造する方法としては、例えば公知の方法 [アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション (American Journal of Clinical Nutrition), 63, 639S (1996); アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション (American Journal of Clinical Nutrition), 63, 627S (1996); バイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 9, 830 (1991)] に準じて遺伝子を導入して造成した動物中に目的とする抗体組成物を生産する方法があげられる。

動物個体の場合は、例えば、抗体分子をコードするDNAを導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、抗体組成物を該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク（特開昭63-309192）、卵等をあげることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである α カゼインプロモーター、 β カゼインプロモーター、 β ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

植物個体を用いて抗体組成物を製造する方法としては、例えば抗体分子をコードするDNAを導入したトランスジェニック植物を公知の方法〔組織培養，20（1994）；組織培養，21（1995）；トレンド・イン・バイオテクノロジー（Trends in Biotechnology），15，45（1997）〕に準じて栽培し、抗体組成物を該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を生産する方法があげられる。

抗体分子をコードする遺伝子を導入した形質転換体により製造された抗体組成物は、例えば抗体組成物が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（DEAE）-セファロース、DIAION HPA-75（三菱化学（株）製）等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF（Pharmacia社）等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

また、抗体組成物が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として抗体組成物の不溶体を回収する。回収した抗体組成物の不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該抗体組成物を正常な立体構造に戻した後、

上記と同様の単離精製法により該抗体組成物の精製標品を得ることができる。

抗体組成物が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該抗体組成物あるいはその誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

このようにして取得される抗体組成物として、例えば、抗体、抗体の断片、抗体のFc領域を有する融合タンパク質などを挙げることができる。

以下に、本発明の抗体組成物の取得のより具体的な例として、ヒト化抗体の組成物の製造方法について記すが、他の抗体組成物を当該方法と同様にして取得することもできる。

(1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体の重鎖（H鎖）及び軽鎖（L鎖）C領域をコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子をそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

ヒト抗体のC領域としては、任意のヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域であることができ、例えば、ヒト抗体のH鎖のIgG1サブクラスのC領域（以下、hC γ 1と表記する）及びヒト抗体のL鎖の κ クラスのC領域（以下、hC κ と表記する）等があげられる。

ヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンから成る染色体DNAを用いることができ、また、cDNAを用いることもできる。

動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体のC領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [ジーン(Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 78, 1527 (1981)]、pSG1 β d2-4 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 4, 173 (1990)]等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーターとエンハンサー [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスのLTR [バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochem.

Biophys. Res. Commun.), 149, 960 (1987)]、免疫グロブリンH鎖のプロモーター [セル(Cell), 41, 479 (1985)] とエンハンサー [セル(Cell), 33, 717 (1983)] 等があげられる。

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体H鎖及びL鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ（以下、タンデム型と表記する）のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体H鎖及びL鎖の発現量のバランスが均衡する等の点からタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ(J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)]。タンデム型のヒト化抗体発現ベクターとしては、pKANTEX93[モレキュラー・イムノロジー(Mol. Immunol.), 37, 1035 (2000)]、pEE18[ハイブリドーマ(Hybridoma), 17, 559 (1998)]などがあげられる。

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体及びヒト型CDR移植抗体の動物細胞での発現に使用できる。

(2) ヒト以外の動物の抗体のV領域をコードするcDNAの取得

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAは以下のようにして取得することができる。

目的のマウス抗体を産生するハイブリドーマ細胞よりmRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAをファージ或いはプラスミド等のベクターにクローニングしてcDNAライブラリーを作製する。該ライブラリーより、既存のマウス抗体のC領域部分或いはV領域部分をプローブとして用い、H鎖V領域をコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミド及びL鎖V領域をコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的のマウス抗体のH鎖及びL鎖V領域の全塩基配列を決定し、塩基配列よりH鎖及びL鎖V領域の全アミノ酸配列を推定する。

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

ハイブリドーマ細胞から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法 [メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymol.), 154, 3 (1987)]、また全RNAからmRNAを調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 [モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー

・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] 等があげられる。また、ハイブリドーマ細胞からmRNAを調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社製) 等があげられる。

cDNAの合成及びcDNAライブラリー作製法としては、常法 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー(Current Protocols in Molecular Biology), Supplement 1-34]、或いは市販のキット、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL社製) やZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene社製) を用いる方法などがあげられる。

cDNAライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターは、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [ストラテジーズ(Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッズ・リサーチ(Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、λ zap II (Stratagene社製)、λ gt10、λ gt11 [ディーエヌエー・クローニング: ア・プラクティカル・アプローチ(DNA Cloning: A Practical Approach), I, 49 (1985)]、Lambda BlueMid (Clontech社製)、λ ExCell、pT7T3 18U (Pharmacia社製)、pcD2 [モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] 及びpUC18 [ジーン(Gene), 33, 103 (1985)] 等が用いられる。

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌としては該cDNAライブラリーを導入、発現及び維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [ストラテジーズ(Strategies), 5, 81 (1992)]、C600 [ジェネティックス(Genetics), 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [サイエンス(Science), 222, 778 (1983)]、NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] 及びJM105 [ジーン(Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

cDNAライブラリーからのヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAクローンの選択法としては、アイソトープ或いは蛍光標識したプローブを用

いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはブランク・ハイブリダイゼーション法 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNAから合成したcDNA或いはcDNAライブラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction [以下、PCR法と表記する; モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー (Current Protocols in Molecular Biology), Supplement 1-34] によりH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAを調製することもできる。

上記方法により選択されたcDNAを、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.), 74, 5463 (1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、A. L. F. DNAシーケンサー (Pharmacia社製) 等を用いて解析することで該cDNAの塩基配列を決定することができる。

決定した塩基配列からH鎖及びL鎖V領域の全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体のH鎖及びL鎖V領域の全アミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することにより、取得したcDNAが分泌シグナル配列を含む抗体のH鎖及びL鎖V領域の完全なアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。

さらに、抗体可変領域のアミノ酸配列または該可変領域をコードするDNAの塩基配列がすでに公知である場合には、以下の方法を用いて製造することができる。

アミノ酸配列が公知である場合には、アミノ酸配列を、コドンの使用頻度 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] を考慮してDNA配列に変換し、設計したDNA配列に基づき、100塩基前後の長さから成る数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR法を行うことによりDNAを得ることができる。塩基配列が公知である場合には、その情報を基に100塩基前後の長さから

成る数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR法を行うことによりDNAを得ることができる。

(3) ヒト以外の動物の抗体のV領域のアミノ酸配列の解析

分泌シグナル配列を含む抗体のH鎖及びL鎖V領域の完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のH鎖及びL鎖V領域の全アミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することにより、分泌シグナル配列の長さ及びN末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、H鎖及びL鎖V領域の各CDRのアミノ酸配列についても、既知の抗体のH鎖及びL鎖V領域のアミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することによって見出すことができる。

(4) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

本項3の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子上流に、ヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAをクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAを、ヒト以外の動物の抗体H鎖及びL鎖V領域の3'末端側の塩基配列とヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域の5'末端側の塩基配列とから成り、かつ適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成DNAとそれぞれ連結し、それぞれを本項3の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

(5) ヒト型CDR移植抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAは、以下のようにして構築することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域のCDRを移植するヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のフレームワーク (以下、FRと表記する) のアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank等のデータベースに登録されているヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域

のFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のH鎖及びL鎖のV領域のFRの各サブグループの共通アミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] 等があげられるが、その中でも、十分な活性を有するヒト型CDR移植抗体を作製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性（少なくとも60%以上）を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。

次に、選択したヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRのアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域のCDRのアミノ酸配列を移植し、ヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域のアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] を考慮してDNA配列に変換し、ヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列を設計する。設計したDNA配列に基づき、100塩基前後の長さから成る数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR法を行う。この場合、PCRでの反応効率及び合成可能なDNAの長さから、H鎖、L鎖とも4～6本の合成DNAを設計することが好ましい。

また、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項3の(1)で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。PCR後、増幅産物をpBluescript SK(-) (Stratagene社製) 等のプラスミドにクローニングし、本項3の(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するプラスミドを取得する。

(6) ヒト型CDR移植抗体発現ベクターの構築

本項3の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子上流に、本項3の(5)で構築したヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAをクローニングし、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、本項3の(5)でヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域を構築する際に用いる合成DNAのうち、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項3の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子上流にそれらが

適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。

(7) ヒト化抗体の安定的生産

本項3の(4)及び(6)に記載のヒト化抗体発現ベクターを適当な動物細胞に導入することによりヒト型キメラ抗体及びヒト型CDR移植抗体(以下、併せてヒト化抗体と称す)を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

動物細胞へのヒト化抗体発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法[特開平2-257891; サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターを導入する動物細胞としては、ヒト化抗体を生産させることができる動物細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。

具体的には、マウスミエローマ細胞であるNS0細胞、SP2/0細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO/dhfr-細胞、CHO/DG44細胞、ラットミエローマYB2/0細胞、IR983F細胞、シリアンハムスター腎臓由来であるBHK細胞、ヒトミエローマ細胞であるナマルバ細胞などがあげられるが、好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣細胞であるCHO/DG44細胞、ラットミエローマYB2/0細胞等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、G418 sulfate (以下、G418と表記する; SIGMA社製)等の薬剤を含む動物細胞培養用培地により選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640培地(日水製薬社製)、GIT培地(日本製薬社製)、EX-CELL302培地(JRH社製)、IMDM培地(GIBCO BRL社製)、Hybridoma-SFM培地(GIBCO BRL社製)、またはこれら培地に牛胎児血清(以下、FCSと表記する)等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中にヒト化抗体を生産蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の生産量及び抗原結合活性は酵素免疫抗体法[以下、ELISA法と表記する; アンティボディズ: ア・ラボラトリー・マニユアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1998、モノクローナル・アンティボディズ: プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996]等により測定できる。また、形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、DHFR遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる。

ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテインAカラムを用いて精製することができる [アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル (Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8, 1988、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルス・アンド・プラクティス (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996]。また、その他に通常、タンパク質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体のH鎖、L鎖或いは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 [以下、SDS-PAGEと表記する；ネイチャー (Nature), 227, 680 (1970)] やウエスタンブロッティング法 [アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル (Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12, 1988、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルス・アンド・プラクティス (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996] 等で測定することができる。

以上、動物細胞を宿主とした抗体組成物の製造方法を示したが、上述したように、酵母、昆虫細胞、植物細胞または動物個体あるいは植物個体においても動物細胞と同様の方法により抗体組成物を製造することができる。

すでに宿主細胞が抗体分子を発現する能力を有する場合には、後述1に記載した方法を用いて抗体分子を発現させる細胞を調製した後に、該細胞を培養し、該培養物から目的とする抗体組成物を精製することにより、本発明の抗体組成物を製造することができる。

4. 抗体組成物の活性評価

精製した抗体組成物の蛋白量、抗原との結合活性あるいはエフェクター機能を測定する方法としては、モノクローナルアンチボディズ、あるいはアンチボディエンジニアリング等に記載の公知の方法を用いることができる。

その具体的な例としては、抗体組成物がヒト化抗体の場合、抗原との結合活性、抗原陽性培養細胞株に対する結合活性はELISA法及び蛍光抗体法 [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)] 等により測定できる。抗原陽性培養細胞株に対する細胞傷害活性は、CDC活性、ADCC活性等を測定することにより、評価することができる [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)]。

また、抗体組成物のヒトでの安全性、治療効果は、カニクイザル等のヒトに比較的近い動物種の適当なモデルを用いて評価することができる。

5. 抗体組成物の糖鎖の分析

各種細胞で発現させた抗体分子の糖鎖構造は、通常の糖タンパク質の糖鎖構造の解析に準じて行うことができる。例えば、IgG分子に結合している糖鎖はガラクトース、マンノース、フコースなどの中性糖、N-アセチルグルコサミンなどのアミノ糖、シアル酸などの酸性糖から構成されており、糖組成分析および二次元糖鎖マップ法などを用いた糖鎖構造解析等の手法を用いて行うことができる。

(1) 中性糖・アミノ糖組成分析

抗体分子の糖鎖の組成分析は、トリフルオロ酢酸等で、糖鎖の酸加水分解を行うことにより、中性糖またはアミノ糖を遊離し、その組成比を分析することができる。

具体的な方法として、Dionex社製糖組成分析装置を用いる方法があげられる。

BioLCはHPAEC-PAD (high performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection) 法 [ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィー (J. Liq. Chromatogr.), 6, 1577 (1983)] によって糖組成を分析する装置である。

また、2-アミノピリジンによる蛍光標識化法でも組成比を分析することができる。具体的には、公知の方法 [アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agric. Biol. Chem.), 55(1), 283-284 (1991)] に従って酸加水分解した試料を2-アミノピリジル化で蛍光ラベル化し、HPLC分析して組成比を算出することができる。

(2) 糖鎖構造解析

抗体分子の糖鎖の構造解析は、二次元糖鎖マップ法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 171, 73 (1988)、生物化学実験法23-糖タンパク質糖鎖研究法 (学会出版センター) 高橋禮子編 (1989年)] により行うことができる。二次元糖鎖マップ法は、例えば、X軸には逆相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、Y軸には順相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、それぞれプロットし、既知糖鎖のそれらの結果と比較することにより、糖鎖構造を推定する方法である。

具体的には、抗体をヒドラジン分解して、抗体から糖鎖を遊離し、2-アミノピリジン (以下、PAと略記する) による糖鎖の蛍光標識 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 95, 197 (1984)] を行った後、ゲルろ過により糖鎖を

過剰のPA化試薬などと分離し、逆相クロマトグラフィーを行う。次いで、分取した糖鎖の各ピークについて順相クロマトグラフィーを行う。これらの結果をもとに、2次元糖鎖マップ上にプロットし、糖鎖スタンダード（TaKaRa社製）、文献〔アナリティカル・バイオケミストリー（Anal. Biochem.）, 171, 73（1988）〕とのスポットの比較より糖鎖構造を推定することができる。

さらに各糖鎖のMALDI-TOF-MSなどの質量分析を行い、2次元糖鎖マップ法により推定される構造を確認することができる。

6. 抗体分子の糖鎖構造を識別する免疫学的定量方法

抗体組成物は、抗体のFc領域に結合する糖鎖構造が異なった抗体分子から構成されている。本発明の抗体組成物は、Fc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が20%以上であり、高いADCC活性を示す特徴を有している。このような抗体組成物は、上記5に記載の抗体分子の糖鎖構造の分析法を用いることにより識別できる。また、レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いることによっても識別できる。

レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いた抗体分子の糖鎖構造の識別は、文献〔モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ（Monoclonal Antibodies: Principles and Applications）, Wiley-Liss, Inc.,（1995）；酵素免疫測定法，第3版，医学書院（1987）；改訂版，酵素抗体法，学際企画（1985）〕等に記載のウエスタン染色、RIA（Radioimmunoassay）、VIA（Viroimmunoassay）、EIA（Enzymoimmunoassay）、FIA（Fluoroimmunoassay）、MIA（Metalloimmunoassay）などの免疫学的定量方法に準じて、例えば、以下のように行うことができる。

抗体組成物を構成する抗体分子の糖鎖構造を認識するレクチンを標識し、標識したレクチンと試料である抗体組成物を反応させる。次に、標識したレクチンと抗体分子の複合体の量を測定する。

抗体分子の糖鎖構造を識別に用いられるレクチンとしては、例えば、WGA（*T. vulgaris*由来のwheat-germ agglutinin）、ConA（*C. ensiformis*由来のconcanavalin A）、RIC（*R. communis*由来の毒素）、L-PHA（*P. vulgaris*由来のleukoagglutinin）、LCA（*L. culinaris*由来のlentil agglutinin）、PSA（*P. sativum*由来のPea lectin）、AAL（*Aleuria aurantia* Lectin）、ACL（*Amaranthus caudatus* Lectin）、BPL（*Bauhinia*

purpurea Lectin)、DSL (*Datura stramonium* Lectin)、DBA (*Dolichos biflorus* Agglutinin)、EBL (*Elderberry Balk* Lectin)、ECL (*Erythrina cristagalli* Lectin)、EEL (*Euonymus europaeus* Lectin)、GNL (*Galanthus nivalis* Lectin)、GSL (*Griffonia simplicifolia* Lectin)、HPA (*Helix pomatia* Agglutinin)、HHL (*Hippeastrum Hybrid* Lectin)、Jacalin、LTL (*Lotus tetragonolobus* Lectin)、LEL (*Lycopersicon esculentum* Lectin)、MAL (*Maackia amurensis* Lectin)、MPL (*Maclura pomifera* Lectin)、NPL (*Narcissus pseudonarcissus* Lectin)、PNA (Peanut Agglutinin)、E-PHA (*Phaseolus vulgaris* Erythroagglutinin)、PTL (*Psophocarpus tetragonolobus* Lectin)、RCA (*Ricinus communis* Agglutinin)、STL (*Solanum tuberosum* Lectin)、SJA (*Sophora japonica* Agglutinin)、SBA (Soybean Agglutinin)、UEA (*Ulex europaeus* Agglutinin)、VVL (*Vicia villosa* Lectin)、WFA (*Wisteria floribunda* Agglutinin) があげられる。

N-グルコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合している糖鎖構造を特異的に認識するレクチンを用いることが好ましく、その具体的な例としては、レンズマメレクチンLCA (*Lens Culinaris*由来のLentil Agglutinin) エンドウマメレクチンPSA (*Pisum sativum*由来のPea Lectin)、ソラマメレクチンVFA (*Vicia faba*由来のAgglutinin)、ヒイロチャワンタケレクチンAAL (*Aleuria aurantia*由来のLectin) を挙げることができる。

7. 本発明の抗体分子の利用

本発明の抗体組成物はCD20に特異的に結合し、高い抗体依存性細胞傷害活性を有するため、癌をはじめとする各種CD20発現細胞関連疾患の予防および治療において有用である。

癌、すなわち悪性腫瘍は癌細胞が増殖し、例えばB細胞性リンパ腫においては特定のB細胞が、異常増殖する。通常の抗癌剤は癌細胞の増殖を抑制することを特徴とする。しかし、高い抗体依存性細胞傷害活性を有する抗体は、殺細胞効果により抗原を発現している癌細胞を傷害することにより癌を治療することができるため、通常の抗癌剤よりも治療薬として有効である。特に癌の治療薬において、現状では抗体医薬単独の抗腫瘍効果は不十分であり、化学療法との併用療法が行われているが [サイエンス (Science), 280, 1197 (1998)]、本発明の抗体組成物単独でのより強い抗腫瘍効果が認められれば、化学療法に対する依存度が低くなり、副作用の低減にもなる。

本発明の抗体組成物を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。または、抗体組成物を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を調製することもできる。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該抗体組成物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体組成物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体組成物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、

これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、有効成分の量として、通常成人1日当たり10 μ g/kg～20mg/kgである。

また、抗体組成物の各種腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検討する方法は、インビトロ実験としては、CDC活性測定法、ADCC活性測定法等があげられ、インビボ実験としては、マウス等の実験動物での腫瘍系を用いた抗腫瘍実験等があげられる。

CDC活性、ADCC活性、抗腫瘍実験は、文献[キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー(Cancer Immunology Immunotherapy), 36, 373 (1993); キャンサー・リサーチ(Cancer Research), 54, 1511 (1994)]等記載の方法に従って行うことができる。

以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、実施例は本発明の単なる例示を示すものにすぎず、本発明の範囲を限定するものではない

図面の簡単な説明

第1図は、プラスミドpBS-2B8Lの構築過程を示した図である。

第2図は、プラスミドpBS-2B8Hmの構築過程を示した図である。

第3図は、プラスミドpKANTEX2B8Pの構築過程を示した図である。

第4図は、蛍光抗体法を用いて、精製した抗CD20キメラ抗体KM3065及びRituxanTMのヒトCD20発現細胞Raji細胞との結合活性を抗体濃度を変化させて測定した結果である。各濃度における相対蛍光強度を縦軸に、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。■がRituxanTM、○がKM3065の活性をそれぞれ示す。

第5図は、蛍光抗体法を用いて、精製した抗CD20キメラ抗体KM3065及びRituxanTMのヒトCD20陰性細胞CCRF-CEM細胞との結合活性を測定した図である。

第6図は、精製した抗CD20キメラ抗体KM3065及びRituxanTMのヒトCD20発現細胞に対するADCC活性を示した図である。AはRaji細胞、BはRamos細胞、CはWIL2-S細胞を標的細胞にしたものである。縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。■がRituxanTM、○がKM3065の活性をそれぞれ示す。

第7図は、精製した抗CD20キメラ抗体KM3065及びRituxanTMからPA化糖鎖を調製し、逆相HPLCで分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第8図は、プラスミドCHfFUT8-pCR2.1の構築を示した図である。

第9図は、プラスミドploxPPuroの構築を示した図である。

第10図は、プラスミドpKOFUT8gE2-1の構築を示した図である。

第11図は、プラスミドpKOFUT8gE2-2の構築を示した図である。

第12図は、プラスミドpscFUT8gE2-3の構築を示した図である。

第13図は、プラスミドpKOFUT8gE2-3の構築を示した図である。

第14図は、プラスミドpKOFUT8gE2-4の構築を示した図である。

第15図は、プラスミドpKOFUT8gE2-5の構築を示した図である。

第16図は、プラスミドpKOFUT8Puroの構築を示した図である。

第17図は、蛍光抗体法を用いて、レクチン耐性CHO/DG44細胞が生産した抗CD20キメラ抗体R92-3-1の結合活性を抗体濃度を変化させて測定した結果である。各濃度における相対蛍光強度を縦軸に、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。■がRituxanTM、○がR92-3-1の活性をそれぞれ示す。

第18図は、レクチン耐性CHO/DG44細胞が生産した抗CD20キメラ抗体R92-3-1のADCC活性を、Raji細胞を標的細胞にして評価した結果を示したものである。グラフの縦軸に標的細胞の細胞傷害活性を、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。■がRituxanTM、○がR92-3-1のADCC活性をそれぞれ示す。

第19図は、レクチン耐性CHO/DG44細胞が生産した抗CD20キメラ抗体R92-3-1から調製したPA化糖鎖を、逆相HPLCで分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。逆相HPLCの分析条件、糖鎖構造の同定、 α -1,6-フコースが結合しない糖鎖群の割合の算出は、実施例3と同じ方法で行った。

第20図は、CHO細胞由来のGMD cDNAクローン22-8の5'末端にクローン34-2の5'末端を導入したプラスミドCHO-GMDの作製工程を示した図である。

第21図は、3種類の抗CD20キメラ抗体から調製したPA化糖鎖を、逆相HPLCで分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。逆相HPLCの分析条件、糖鎖構造の同定、 α -1,6-フコース非結合糖鎖群の割合の算出は、実施例3と同じ方法で行った。

第22図は、蛍光抗体法を用いて、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖が結合した抗体分子の割合が異なる5種類の抗CD20キメラ抗体のCD20発現細胞に対する結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸はCD20との結合活性、横軸は抗体濃

度をそれぞれ示す。□が抗CD20キメラ抗体（96%）、■が抗CD20キメラ抗体（44%）、△が抗CD20キメラ抗体（35%）、▲が抗CD20キメラ抗体（26%）、○が抗CD20キメラ抗体（6%）の活性をそれぞれ示す。

第23図は、 α -1, 6-フコースを持たない糖鎖が結合した抗体分子の割合が異なる抗CD20キメラ抗体のWIL2-S細胞に対するADCC活性を示した図である。ドナーAのエフェクター細胞を用いて51Cr法により測定した結果を示し、縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。□が抗CD20キメラ抗体（96%）、■が抗CD20キメラ抗体（44%）、△が抗CD20キメラ抗体（35%）、▲が抗CD20キメラ抗体（26%）、○が抗CD20キメラ抗体（6%）の活性をそれぞれ示す。

第24図は、 α -1, 6-フコースを持たない糖鎖が結合した抗体分子の割合が異なる抗CD20キメラ抗体のRaji細胞に対するADCC活性を示した図である。ドナーBのエフェクター細胞を用いてLDH法により測定した結果を示し、縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。□が抗CD20キメラ抗体（96%）、■が抗CD20キメラ抗体（44%）、△が抗CD20キメラ抗体（35%）、▲が抗CD20キメラ抗体（26%）、○が抗CD20キメラ抗体（6%）の活性をそれぞれ示す。

第25図は、抗CD20キメラ抗体KM3065を、バイセクティングGlcNAcを持つ糖鎖に親和性があるレクチンが固定化されたカラムを用いて分離した溶離図を示したものである。縦軸に280nmにおける吸光度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。①～④は、それぞれ画分①～画分④の溶出位置を示す。

第26図は、バイセクティングGlcNAcを持つ糖鎖に親和性があるレクチンが固定化されたカラムを用いて分離した画分①～④と、分離前の抗CD20キメラ抗体KM3065から調製したPA化糖鎖を、それぞれ逆相HPLCで分析して得た溶離図を示したものである。上段左図に分離前のKM3065、上段右図に画分①、中段左図に画分②、中段右図に画分③、下段左図に画分④の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。図中黒く塗りつぶしたピークは抗体由来のPA化糖鎖を示し、「*」はバイセクティングGlcNAcを持つPA化糖鎖を示す。

第27図は、バイセクティングGlcNAcを持つ糖鎖に親和性があるレクチンが固定化されたカラムを用いて分離した画分①～④、ならびに分離前の抗CD20キメラ抗体KM3065の、Raji細胞に対するADCC活性を示した図である。健常人ドナー由来のエフェクター細胞を用いてLDH法により測定した結果を示し、縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。●が分離前のKM3065、○が画分①、△が画分②、◇が

画分③、◆が画分④、□がRituxan™、×が抗体非添加の活性をそれぞれ示す
発明を実施するための最良の形態

実施例1. 抗CD20ヒト型キメラ抗体の作製

1. 抗CD20ヒト型キメラ抗体発現ベクターの作製

(1) 抗CD20マウスモノクローナル抗体のL鎖V領域をコードするcDNAの構築

W094/11026に記載されている抗CD20マウスモノクローナル抗体2B8のL鎖V領域(以下VLと表記する)のアミノ酸配列をコードするcDNA(配列番号11に記載)をPCR法を用いて以下の様にして構築した。

まず、W094/11026記載のVLの塩基配列の5'末端と3'末端にPCR反応時の増幅用プライマーの結合塩基配列(ヒト化抗体発現用ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む)を付加した。設計した塩基配列を5'末端側から約100塩基ずつ計6本の塩基配列に分け(隣り合う塩基配列は、その末端に約20塩基の重複配列を有する様にする)、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順で、実際には、配列番号15、16、17、18、19、および20の6本の合成DNAを作製(GENSET社製へ委託)した。

各オリゴヌクレオチドを最終濃度が0.1 μ Mとなる様に、50 μ Lの反応液[KOD DNA Polymerase添付PCR Buffer #1(東洋紡績社製)、0.2mM dNTPs、1mM塩化マグネシウム、0.5 μ M M13 primer M4(宝酒造社製)、0.5 μ M M13 primer RV(宝酒造社製)]に添加し、DNAサーマルサイクラーGeneAmp PCR System 9600(Perkin Elmer社製)を用いて、94℃にて3分間加熱した後、2.5単位のKOD DNA Polymerase(東洋紡績社製)を添加し、94℃にて30秒間、55℃にて30秒間、74℃にて1分間のサイクルを25サイクル行ない、更に72℃にて10分間反応させた。該反応液25 μ Lをアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いて、約0.44kbのVLのPCR産物を回収した。

次に、プラスミドpBluescriptII SK(-)(Stratagene社製)を制限酵素Sma I(宝酒造社製)して得られたDNA0.1 μ gと、上記で得られたPCR産物約0.1 μ gを滅菌水に加えて7.5 μ Lとし、TAKARA ligation kit ver.2のsolution I(宝酒造社製)7.5 μ L、制限酵素Sma I(宝酒造社製)0.3 μ Lを加えて22℃で2時間反応させた。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株(東洋紡績社製)を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0(Applied Biosystems社製

）を用いて添付の説明書に従って反応後、同社のDNAシーケンサABI PRISM 377により塩基配列を解析した。こうして目的の塩基配列を有する第1図に示したプラスミドpBS-2B8Lを得た。

（2）抗CD20マウスモノクローナル抗体のH鎖V領域をコードするcDNAの構築

W094/11026に記載されている抗CD20マウスモノクローナル抗体2B8のH鎖V領域（以下VHと表記する）のアミノ酸配列をコードするcDNA（配列番号13に記載）をPCR法を用いて以下の様にして構築した。

まず、W094/11026記載のVHの塩基配列の5'末端と3'末端にPCR反応時の増幅用プライマーの結合塩基配列（ヒト化抗体発現用ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む）を付加した。設計した塩基配列を5'末端側から約100塩基ずつ計6本の塩基配列に分け（隣り合う塩基配列は、その末端に約20塩基の重複配列を有する様にする）、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順で、実際には、配列番号25、26、27、28、29、および30の6本の合成DNAを作製（GENSET社製へ委託）した。

各オリゴヌクレオチドを最終濃度が0.1 μ Mとなる様に、50 μ Lの反応液[KOD DNA Polymerase添付PCR Buffer #1（東洋紡績社製）、0.2mM dNTPs、1mM塩化マグネシウム、0.5 μ M M13 primer M4（宝酒造社製）、0.5 μ M M13 primer RV（宝酒造社製）]に添加し、DNAサーマルサイクラーGeneAmp PCR System 9600（Perkin Elmer社製）を用いて、94℃にて3分間加熱した後、2.5単位のKOD DNA Polymerase（東洋紡績社製）を添加し、94℃にて30秒間、55℃にて30秒間、74℃にて1分間のサイクルを25サイクル行い、更に72℃にて10分間反応させた。該反応液25 μ Lをアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて、約0.49 kbのVHのPCR産物を回収した。

次に、プラスミドpBluescriptII SK(-)（Stratagene社製）を制限酵素Sma I（宝酒造社製）して得られたDNA0.1 μ gと、上記で得られたPCR産物約0.1 μ gを滅菌水に加えて7.5 μ Lとし、TAKARA ligation kit ver.2のsolution I（宝酒造社製）7.5 μ L、制限酵素Sma I（宝酒造社製）0.3 μ Lを加えて22℃で一晩反応させた。

この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株（東洋紡績社製）を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0（Applied Biosystems社製）を用いて添付の説明書に従って反応後、同社のDNAシーケンサABI PRISM 377

により塩基配列を解析した。こうして目的の塩基配列を有する第2図に示したプラスミドpBS-2B8Hを得た。

次に、14番目のアミノ酸残基をAlaからProへ置換するために、配列番号31で示した合成DNAを設計し、LA PCR *in vitro* Mutagenesis Primer Set for pBluescriptII (宝酒造社製)を用いたPCR法により、以下の様に塩基の置換を行った。上記のプラスミドpBS-2B8Hを1ng含む50 μ Lの反応液[LA PCR Buffer II(宝酒造社製)、2.5単位のTaKaRa LA Taq、0.4mM dNTPs、2.5mM 塩化マグネシウム、50nM T3 BcaBEST Sequencing primer (宝酒造社製)、50nM 上記の変異導入用プライマー(配列番号31、GENSET社製)]を調製し、DNAサーマルサイクラーGeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer社製)を用いて、94℃にて30秒間、55℃にて2分間、72℃にて1分30秒間のサイクルを25サイクル行なった。該反応液30 μ Lをアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて、約0.44kbのPCR産物を回収し、30 μ Lの水溶液とした。また、同様に、上記のプラスミドpBS-2B8Hを1ng含む50 μ Lの反応液[LA PCR Buffer II(宝酒造社製)、2.5単位のTaKaRa LA Taq、0.4mM dNTPs、2.5mM 塩化マグネシウム、50nM T7 BcaBEST Sequencing primer(宝酒造社製)、50nM MUT B1 primer(宝酒造社製)]のPCR反応を行った。該反応液30 μ Lをアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて、約0.63kbのPCR産物を回収し、30 μ Lの水溶液とした。続いて、上記で得られた0.44kbのPCR産物と0.63kbのPCR産物を0.5 μ Lずつ47.5 μ Lの反応液[LA PCR Buffer II(宝酒造社製)、0.4mM dNTPs、2.5mM塩化マグネシウム]に添加し、DNAサーマルサイクラーGeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer社製)を用いて、90℃にて10分間加熱した後、60分間かけて37℃まで冷却した後、37℃で15分間保持することによってDNAをアニーリングさせた。2.5単位のTaKaRa LA Taq (宝酒造社製)を添加して72℃にて3分間反応させた後、10pmolずつのT3 BcaBEST Sequencing primer (宝酒造社製)とT7 BcaBEST Sequencing primer (宝酒造社製)を添加して反応液を50 μ Lとし、94℃にて30秒間、55℃にて2分間、72℃にて1分30秒間のサイクルを10サイクル行った。該反応液25 μ LをQIA quick PCR purification kit (QIAGEN社製)にて精製した後、半量を10単位の制限酵素KpnI (宝酒造社製)と10単位の制限酵素SacI (宝酒造社製)を用いて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.59kbのKpnI-SacI断片を回収した。

次に、pBluescriptII SK(-) (Stratagene社製) 1 μ gを10単位の制限酵素Kpn I (

宝酒造社製)と10単位のSacI(宝酒造社製)を用いて37℃で1時間反応させた後、該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.9kbのKpnI-SacI断片を回収した。

上記で得られたPCR産物由来のKpnI-SacI断片とプラスミドpBluescriptII SK(-)由来のKpnI-SacI断片をDNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)のSolution Iを用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株(東洋紡績社製)を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0(Applied Biosystems社製)を用いて添付の説明書に従って反応後、同社のDNAシーケンサABI PRISM 377により塩基配列を解析した。

こうして目的の塩基配列を有する第2図に示したプラスミドpBS-2B8Hmを得た。

(3) 抗CD20ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93(Mol. Immunol., 37, 1035, 2000)と実施例1の1項(1)および(2)で得られたプラスミドpBS-2B8LおよびpBS-2B8Hmを用いて抗CD20ヒト型キメラ抗体(以下、抗CD20キメラ抗体と表記する)の発現ベクターpKANTEX2B8Pを以下の様にして構築した。

実施例1の1項(1)で得られたプラスミドpBS-2B8Lの2 μ gを10単位の制限酵素BsiWI(New England Biolabs社製)を用いて55℃で1時間反応させた後、更に10単位の制限酵素EcoRI(宝酒造社製)を用いて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.41kbのBsiWI-EcoRI断片を回収した。

次に、ヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93の2 μ gを10単位の制限酵素BsiWI(New England Biolabs社製)を用いて55℃で1時間反応させた後、更に10単位の制限酵素EcoRI(宝酒造社製)を用いて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約12.75kbのBsiWI-EcoRI断片を回収した。

次に、上記で得られたプラスミドpBS-2B8L由来BsiWI-EcoRI断片とプラスミドpKANTEX93由来のBsiWI-EcoRI断片をDNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)のSolution Iを用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株(東洋紡績社製)を形質転換し、第3図に示したプラスミドpKANTEX2B8-Lを得た。

次に、実施例1の1項(2)で得られたプラスミドpBS-2B8Hmの2 μ gを10単位の制限酵素ApaI(宝酒造社製)を用いて37℃で1時間反応させた後、更に10単位の制限酵素NotI(宝酒造社製)を用いて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電

電気泳動にて分画し、約0.45kbのApaI-NotI断片を回収した。

次に、上記で得られたプラスミドpKANTEX2B8-Lの3 μ gを10単位の制限酵素ApaI（宝酒造社製）を用いて37℃で1時間反応させた後、更に10単位の制限酵素NotI（宝酒造社製）を用いて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約13.16kbのApaI-NotI断片を回収した。

次に、上記で得られたプラスミドpBS-2B8Hm由来のApaI-NotI断片とプラスミドpKANTEX2B8-L由来のApaI-NotI断片をDNA Ligation Kit Ver.2（宝酒造社製）のSolution Iを用いて、添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製した。

得られたプラスミドを用い、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0（Applied Biosystems社製）を同社のDNAシーケンサー377を用いて塩基配列の解析を行った結果、目的のDNAがクローニングされている第3図に示したプラスミドpKANTEX2B8Pが得られたことを確認した。

2. 抗CD20キメラ抗体の動物細胞を用いた安定発現

（1）ラットミエローマYB/0細胞を用いた生産細胞の作製

上記実施例1の1項（3）で得られた抗CD20キメラ抗体発現ベクターpKANTEX2B8Pを用いて抗CD20キメラ抗体の動物細胞での発現を以下の様にして行った。

プラスミドpKANTEX2B8Pの10 μ gを4 \times 10⁶細胞のラットミエローマ細胞株YB2/0細胞（ATCC CRL1662）へエレクトロポレーション法[サイトテクノロジー（Cytotechnology），3，133（1990）]により導入後、40mlのH-SFM（GIBCO-BRL社製）培地（牛胎児血清（FCS）を5%添加）に懸濁し、96ウェルマイクロタイタープレート（住友ベークライト社製）に200 μ L/ウェルずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37℃、24時間培養した後、G418を1mg/mlになる様に添加して1～2週間培養した。G418耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、コンフルエントになったウェルより培養上清を回収し、培養上清中のヒトIgG抗体の産生量を実施例1の2項（2）に示すELISA法により測定した。

培養上清中にヒトIgG抗体の発現が認められたウェルの形質転換株については、dhfr遺伝子増幅系を利用して抗体発現量を増加させる目的で、G418を1mg/mL、dhfr遺伝子産物のジヒドロ葉酸還元酵素（以下、DHFRと表記する）の阻害剤であるメソトレキセート（以下、MTXと表記する：SIGMA社製）を50nM含むH-SFM培地に1～2 \times 10⁵

細胞/mlになる様に懸濁し、24ウェルプレート（Greiner社製）に1mLずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37℃で1～2週間培養して、50nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株がウェルにコンフルエントになった時点で培養上清中のヒトIgG抗体の産生量を実施例1の2項（2）に示すELISA法により測定した。培養上清中にヒトIgG抗体の発現が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX濃度を100nM、200nMと順次上昇させ、最終的にG418を1mg/mL、MTXを200nMの濃度で含むH-SFM培地で増殖可能かつ、抗CD20キメラ抗体を高発現する形質転換株を得た。得られた形質転換株については、限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行い、抗CD20キメラ抗体を発現するクローンKM3065を取得した。尚、W000/61739の実施例8に示す α -1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し、用いた。

このようにして得られた抗CD20キメラ抗体を生産する形質転換クローンKM3065は平成13年12月21日付で、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）にFERM BP-7834として寄託されている。

（2）培養上清中のヒトIgG抗体濃度の測定（ELISA法）

ヤギ抗ヒトIgG(H&L)抗体(American Qualex社製)をPhosphate Buffered Saline（以下、PBSと表記する）で希釈して1 μ g/mLとし、96穴のELISA用プレート（グラйнаール社製）に、50 μ L/ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。PBSで洗浄後、1%牛血清アルブミン（以下、BSAと表記する；AMPC社製）を含むPBS（以下、1%BSA-PBSと表記する）を100 μ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、形質転換株の培養上清、精製したヒト型キメラ抗体の各種希釈溶液を50 μ L/ウェルで加え、室温で2時間反応させた。反応後、各ウェルを0.05%Tween20を含むPBS（以下、Tween-PBSと表記する）で洗浄後、1%BSA-PBSで3000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(H&L)抗体溶液（American Qualex社製）を二次抗体溶液として、それぞれ50 μ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液[2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウムの0.55gを1Lの0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.2)に溶解し、使用直前に過酸化水素を1 μ L/mLで添加した溶液]を50 μ L/ウェルで加えて発色させ、415nmの吸光度（以下、OD415と表記する）を測定した。

3. 抗CD20キメラ抗体の培養上清からの精製

実施例1の2項(1)で得られた抗CD20キメラ抗体を発現する形質転換細胞クローンKM3065をMTXを200nM、Daigo's GF21(和光純薬製)を5%の濃度で含むH-SFM(GIBCO-BRL社製)に 1×10^5 細胞/mlとなる様に懸濁し、182cm²フラスコ(Greiner社製)に50ml分注した。5%CO₂インキュベーター内で37℃で7日間培養し、コンフルエントになった時点で培養上清を回収した。培養上清よりProsep-A(ミリポア社製)カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗CD20キメラ抗体KM3065を精製した。得られた抗CD20キメラ抗体KM3065の約3 μ gを、公知の方法[ネイチャー(Nature), 227, 680(1970)]に従って電気泳動し、分子量及び精製度を調べた。その結果、精製した抗CD20キメラ抗体KM3065は、非還元条件下は約150キロダルトン(以下、Kdと表記する)であり、還元条件下では約50Kdと約25Kdの2本のバンドが認められた。これらの蛋白質の大きさは、IgG型の抗体は、非還元条件下では分子量は約150Kdであり、還元条件下では分子内のジスルフィド結合(以下、S-S結合と表記する)が切断され、約50Kdの分子量を持つH鎖と約25Kdの分子量を持つL鎖に分解されるという報告[アンティボディズ: ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1988、モノクローナル・アンティボディズ: プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996]と一致し、RituxanTMの泳動パターンともほぼ一致することから、抗CD20キメラ抗体KM3065が正しい構造の抗体分子として発現されていることが確認された。

実施例2. 抗CD20キメラ抗体の活性評価

1. 抗CD20キメラ抗体のCD20発現細胞に対する結合活性(蛍光抗体法)

上記実施例1の3項で得られた精製CD20キメラ抗体の結合活性をフローサイトメトリーを用いた蛍光抗体法によって評価した。CD20陽性細胞であるヒトリンパ腫細胞株Raji細胞(JCRB9012)を 2×10^5 個ずつ、96ウェルU字プレート(Falcon社製)に分注した。抗CD20キメラ抗体をFACS用緩衝液(1%BSA-PBS、0.02%EDTA、0.05%NaN₃)にて希釈した抗体溶液(濃度0.039~40 μ g/mL)を50 μ L/ウェルとして加え、氷中で30分間反応させた。FACS用緩衝液にて200 μ L/ウェルで2回洗浄後、PE標識抗ヒトIgG抗体(コールター社製)をFACS用緩衝液を用いて100倍希釈したものを50 μ L/ウェル加えた。遮光し氷中で30分間反応させた後、200 μ L/ウェルで3回洗浄し、最終的に500 μ Lに懸濁して、フローサイトメーターで蛍光強度を測定した。その結果を第4図に示した。KM3065、RituxanTMともに抗体濃度依存的に蛍光強度の増加が認められ、

ほぼ同等の結合活性を示すことが確認された。また、CD20陰性細胞であるヒト CCRF-CEM細胞 (ATCC CCL119) に対する結合活性を抗体濃度を $40 \mu\text{g/mL}$ として同様の方法により検討した。その結果を第 5 図に示した。KM3065、RituxanTMともに結合せず、KM3065はCD20特異的に結合することが示唆された。

2. 抗CD20キメラ抗体の *in vitro* 細胞傷害活性 (ADCC活性)

上記実施例1の3項で得られた精製抗CD20キメラ抗体の *in vitro* 細胞傷害活性を評価するため、以下に示す方法に従い、ADCC活性を測定した。

(1) 標的細胞溶液の調製

RPMI1640-FCS (10) 培地 (FCSを10%含むRPMI1640培地 (GIBCO BRL社製)) で培養したヒトBリンパ球培養細胞株WIL2-S 細胞 (ATCC CRL8885) あるいはRamos細胞 (ATCC CRL1596)、Raji細胞 (JCRB9012) を遠心分離操作及び懸濁により RPMI1640-FCS (5) 培地 (FCSを5%含むRPMI1640培地 (GIBCO BRL社製)) で洗浄した後、RPMI1640-FCS (5) 培地によって、 2×10^5 細胞/mLに調製し、標的細胞溶液とした。

(2) エフェクター細胞溶液の調製

健常人静脈血50mLを採取し、ヘパリンナトリウム (清水製薬社製) 0.5mLを加え穏やかに混ぜた。これをLymphoprep (AXIS SHIELD社製) を用いて使用説明書に従い、遠心分離 (800g、20分間) して単核球層を分離した。RPMI1640-FCS (5) 培地で3回遠心分離して洗浄後、同培地を用いて 4×10^6 細胞/mLの濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

(3) ADCC活性の測定

96ウェルU字底プレート (Falcon社製) の各ウェルに上記 (1) で調製した標的細胞溶液の $50 \mu\text{L}$ (1×10^4 細胞/ウェル) を分注した。次いで (2) で調製したエフェクター細胞溶液を $50 \mu\text{L}$ (2×10^5 細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は20:1となる) 添加した。更に、各種抗CD20キメラ抗体を各最終濃度 $0.3 \sim 3000 \text{ ng/mL}$ となるように加えて全量を $150 \mu\text{L}$ とし、 37°C で4時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 活性を、CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega社製) を用いて、添付の説明書にしたがって吸光度データを取得することで測定した。標的細胞自然遊離の吸光度データは、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて、また、エフェクター細胞自然遊離の吸光度データは、標的細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて、上記と同様の操作を行うことで取得した。標的細胞全遊離の吸光度データは、抗体溶

液、エフェクター細胞溶液の代わりに培地を用い、反応終了45分前に15 μ Lの9% Triton X-100溶液を添加し、上記と同様の操作を行い、上清のLDH活性を測定することにより求めた。ADCC活性は次式により求めた。

$$\text{細胞傷害活性(\%)} = \frac{[\text{検体の吸光度}] - [\text{エフェクター細胞自然遊離の吸光度}] - [\text{標的細胞自然遊離の吸光度}]}{[\text{標的細胞全遊離の吸光度}] - [\text{標的細胞自然遊離の吸光度}]} \times 100$$

第6図には3種類の細胞株を標的とした結果を示した。第6図AはRaji細胞(JCRB9012)を、第6図BはRamos細胞を(ATCC CRL1596)、第6図CはWIL2-S細胞(ATCC CRL8885)を標的とした結果である。第6図に示したように、KM3065はいずれの抗体濃度においてもRituxanTMよりも高いADCC活性を示し、最高細胞傷害活性値も高かった。

実施例3. 抗CD20キメラ抗体の糖鎖解析

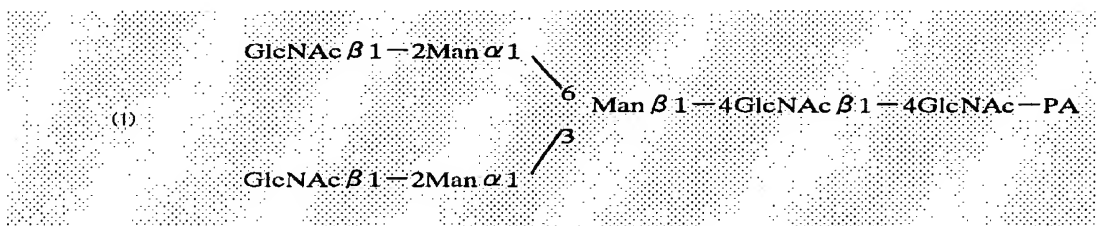
実施例1の3項で精製した抗CD20キメラ抗体の糖鎖解析を行った。KM3065及びRituxanTMのヒドラジン分解を行い、糖鎖をタンパク質から切断した[メソッズ・イン・エンザイモロジー (Method in Enzymology), 83, 263 (1982)]。減圧留去することによってヒドラジンを除去した後、酢酸アンモニウム水溶液と無水酢酸加えてN-アセチル化を行った。凍結乾燥後、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行った[ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95, 197, 1984]。蛍光標識した糖鎖群(以下、PA化糖鎖群と表記する)を、Surperdex Peptide HR 10/30カラム(Pharmacia社製)を用いて過剰な試薬と分離した。糖鎖画分を遠心濃縮機にて乾固させ、精製PA化糖鎖群とした。次に、CLC-ODSカラム(Shimadzu社製)を用いて、精製PA化糖鎖群の逆相HPLC分析を行った。

第7図は、抗CD20キメラ抗体から調製したPA化糖鎖を、それぞれ逆相HPLCで分析して得た溶離図を示したものである。第7図AにKM3065、第7図BにRituxanTMの溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。緩衝液Aとして10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH3.8)、緩衝液Bとして10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH3.8) + 0.5%1-ブタノールを用い、以下のグラジエントで分析した。

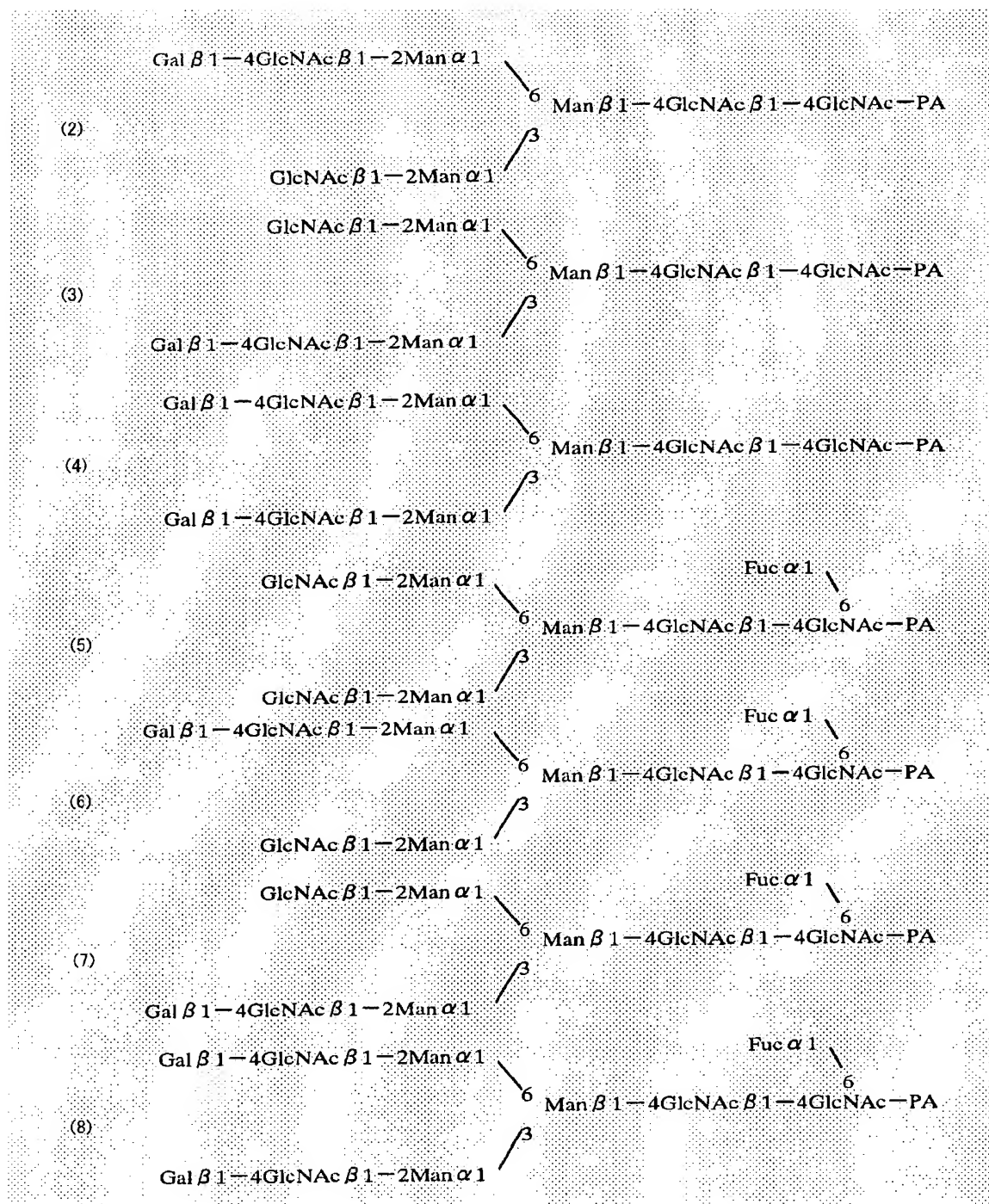
第 1 表

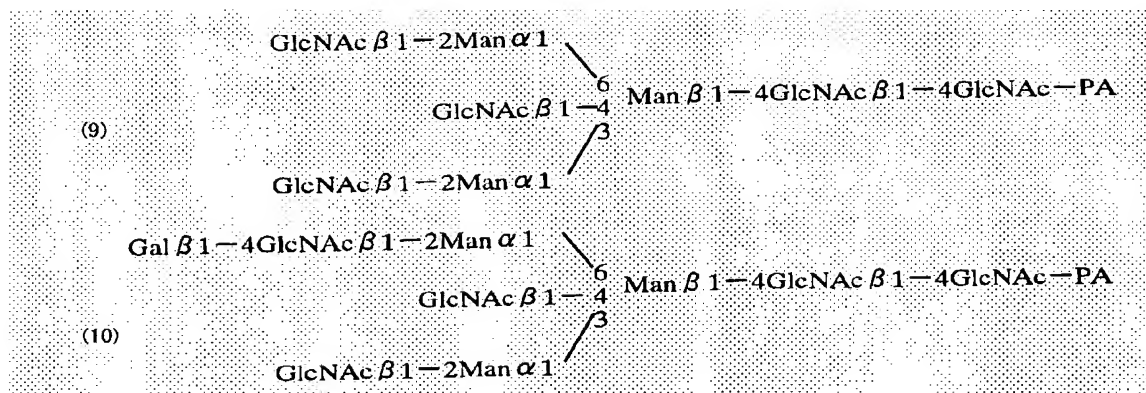
時間 (分)	0	80	90	90.1	120
緩衝液 B (%)	0	60	60	0	0

第7図で示した①～⑩のピークは、以下 (1) ～ (10) に記載された構造を示す。



(以下余白)





GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、Galはガラクトース、Manはマンノース、Fucはフコース、PAはピリジルアミノ基を示す。第7図において、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの1位にフコースの6位が α 結合しない糖鎖群（以下、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖群または α -1,6-フコースが結合しない糖鎖群と記す）の割合は、①～⑩の各ピークが占める面積の合計のうち①～④、⑨および⑩のピークが占める面積の合計から算出した。また、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの1位にフコースの6位が α 結合した糖鎖群（以下、 α -1,6-フコースが結合した糖鎖群と記す）の割合は、①～⑩の各ピークが占める面積の合計のうち⑤～⑧のピークが占める面積の合計から算出した。

その結果、RituxanTMの α -1,6-フコースが結合しない糖鎖含量は6%、 α -1,6-フコース結合糖鎖含量は94%であった。KM3065の α -1,6-フコースが結合しない糖鎖含量は96%、 α -1,6-フコース結合糖鎖含量は4%であった。以上の結果から、KM3065は α -1,6-フコースが結合しない糖鎖含量の割合が多いことがわかった。

実施例4. CHO細胞 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ（FUT8）遺伝子の取得

(1) CHO細胞 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ（FUT8）cDNA配列の取得

W000/61739の実施例8(1)において培養2日目のチャイニーズハムスター卵巢由来CHO/DG44細胞より調製した一本鎖cDNAより、以下の手順でチャイニーズハムスターFUT8 cDNAを取得した（第8図）。

まず、マウスFUT8のcDNA配列（GenBank, AB025198）より、5'側非翻訳領域に特異的なフォワードプライマー（配列番号21に示す）および3'側非翻訳領域に特異的なリバースプライマー（配列番号22に示す）を設計した。

次にDNAポリメラーゼExTaq（宝酒造社製）を用いて、前述のCHO/DG44細胞由来cDNA 1 μ lを含む25 μ lの反応液〔ExTaq buffer（宝酒造社製）、0.2mmol/l dNTPs、4%DMSO、0.5 μ mol/l 上記特異的プライマー（配列番号21および配列番号22）〕を調製し、

PCRを行った。PCRは、94℃で1分間の加熱の後、94℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして30サイクルの後、さらに72℃で10分間加熱する条件で行った。

PCR後、反応液を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片約2Kbを精製した。このDNA断片4 μ lを、TOPO TA cloning Kit (Invitrogen社製)の説明書に従ってプラスミドpCR2.1へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換した。得られたカナマイシン耐性コロニーのうちcDNAが組み込まれた8クローンから、公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。

各プラスミドに挿入されたcDNAの塩基配列は、DNAシーケンサー377 (Applied Biosystems社製) およびBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems社製) を使用して決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により、全ての挿入cDNAが、CHO細胞FUT8のORF全長を含む配列をコードすることを確認した。このうちPCRに伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミドDNAを選択した。以下、本プラスミドをCHfFUT8-pCR2.1と称す。決定したCHO細胞FUT8 cDNAの塩基配列を配列番号1に示す。配列番号1の翻訳部分(オープンリーディングフレーム: ORF) は、塩基配列100~1827であり、終止コドンを除く塩基番号100~1824に対応するアミノ酸配列を配列番号23に示す。

(2) CHO細胞 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) ゲノム配列の取得

本項(1)で取得したCHO細胞FUT8 ORF全長cDNA断片をプローブとして用い、CHO-K1細胞由来 λ -ファージゲノムライブラリー (STRATEGENE社製) よりモレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、A Laboratory Manual, 2nd Ed. (1989) 等に記載の公知のゲノムスクリーニングの方法に従いCHO細胞FUT8ゲノムクローンを取得した。次に、取得したゲノムクローンを各種制限酵素を用いて消化後、CHO細胞FUT8 cDNAの開始コドンを含むAfaI-Sau3AI断片(約280bp)をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い、陽性を示した制限酵素断片のうちXbaI-XbaI断片(約2.5Kb) およびSacI-SacI断片(約6.5Kb)を選択してpBluescriptII KS(+) (Strategene社製)へ各々挿入した。

取得した各ゲノム断片の塩基配列は、DNAシーケンサー377 (Applied Biosystems社製) およびBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems社製) を用いて決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により、XbaI-XbaI断片はCHO細胞FUT8のエクソン2を含む上流イントロン約2.5Kbの配列を、

SacI-SacI断片はCHO細胞FUT8のエクソン2を含む下流イントロン約6.5Kbの配列を各々コードすることを確認した。以下、XbaI-XbaI断片を含むプラスミドをpFUT8fgE2-2、SacI-SacI断片を含むプラスミドをpFUT8fgE2-4と称す。決定したCHO細胞FUT8のエクソン2を含むゲノム領域の塩基配列（約9.0Kb）を配列番号3に示す。

実施例 5. α -1,6-フコース転移酵素遺伝子を破壊したCHO細胞の作製

CHO細胞 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ（FUT8）遺伝子エクソン2を含むゲノム領域を欠失したCHO細胞を作製し、該細胞が生産する抗体のADCC活性を評価した。

1. チャイニーズハムスター α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ（FUT8）遺伝子エクソン2ターゲティングベクタープラスミドpK0FUT8Puroの構築

(1) プラスミドploxPPuroの構築

以下の手順でプラスミドploxPPuroを構築した（第9図）。

プラスミドpK0SelectPuro（Lexicon社製）1.0 μ gをNEBuffer 4（New England Biolabs社製）35 μ lに溶解し、20単位の制限酵素AscI（New England Biolabs社製）を加えて37°Cで2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8%（w/v）アガロースゲル電気泳動に供し、ピューロマイシン耐性遺伝子発現ユニットを含む約1.5KbのDNA断片を精製した。

一方、特開平11-314512に記載のプラスミドploxP 1.0 μ gをNEBuffer 4（New England Biolabs社製）35 μ lに溶解し、20単位の制限酵素AscI（New England Biolabs社製）を加えて37°Cで2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8%（w/v）アガロースゲル電気泳動に供し、約2.0KbのDNA断片を精製した。

上記で得たプラスミドpK0SelectPuro由来のAscI-AscI断片（約1.5Kb）4.5 μ l、プラスミドploxP由来のAscI-AscI断片（約2.0Kb）0.5 μ l、Ligation High（東洋紡社製）5.0 μ lを混合し、16°Cで30分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。本プラスミドを以下、ploxPPuroと称す。

(2) プラスミドpK0FUT8gE2-1の構築

実施例 4（2）で得たチャイニーズハムスターFUT8のエクソン2を含むゲノム領域を有するプラスミドpFUT8fgE2-2を用いて、以下の手順でプラスミドpK0FUT8gE2-1を構築した（第10図）。

プラスミドpFUT8fgE2-2 2.0 μ gを、100 μ g/ml BSA（New England Biolabs社製）を

含むNEBuffer 1 (New England Biolabs社製) 35 μ lに溶解し、制限酵素SacI (New England Biolabs社製) 20単位を加えて37°Cで2時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、100 μ g/ml BSA (New England Biolabs社製) を含むNEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 35 μ lに溶解し、20単位の制限酵素EcoRV (New England Biolabs社製) を加えて37°Cで2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約1.5KbのDNA断片を精製した。

一方、プラスミドLITMUS28 (New England Biolabs社製) 1.0 μ gを、100 μ g/ml BSA (New England Biolabs社製) を含むNEBuffer 1 (New England Biolabs社製) 35 μ lに溶解し、制限酵素SacI (New England Biolabs社製) 20単位を加えて37°Cで2時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、100 μ g/ml BSA (New England Biolabs社製) を含むNEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 35 μ lに溶解し、20単位の制限酵素EcoRV (New England Biolabs社製) を加えて37°Cで2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約2.8KbのDNA断片を精製した。

上記で得たプラスミドpFUT8fgE2-2由来のEcoRV-SacI断片 (約1.5Kb) 4.5 μ l、プラスミドLITMUS28由来のEcoRV-SacI断片 (約2.8Kb) 0.5 μ l、Ligation High (東洋紡社製) 5.0 μ lを混合し、16°Cで30分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-1と称す。

(3) プラスミドpKOFUT8gE2-2の構築

本項 (2) で得たプラスミドpKOFUT8gE2-1を用いて、以下の手順でプラスミドpKOFUT8gE2-2を構築した (第11図)。

プラスミドpKOFUT8gE2-1 2.0 μ gを、100 μ g/ml BSA (New England Biolabs社製) を含むNEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 30 μ lに溶解し、制限酵素EcoRV (New England Biolabs社製) 20単位を加えて37°Cで2時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、100 μ g/ml BSA (New England Biolabs社製) を含むNEBuffer 1 (New England Biolabs社製) 30 μ lに溶解し、20単位の制限酵素KpnI (New England Biolabs社製) を加えて37°Cで2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約1.5Kbの

DNA断片を精製した。

一方、プラスミドploxPPuro 1.0 μ gを、NEBuffer 4 (New England Biolabs社製) 30 μ lに溶解し、制限酵素HpaI (New England Biolabs社製) 20単位を加えて37°Cで2時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、100 μ g/ml BSA (New England Biolabs社製) を含むNEBuffer 1 (New England Biolabs社製) 30 μ lに溶解し、20単位の制限酵素KpnI (New England Biolabs社製) を加えて37°Cで2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約3.5KbのDNA断片を精製した。

上記で得たプラスミドpKOFUT8gE2-1由来のEcoRV-KpnI断片 (約1.5Kb) 4.0 μ l、プラスミドploxPPuro由来のHpaI-KpnI断片 (約3.5Kb) 1.0 μ l、Ligation High (東洋紡社製) 5.0 μ lを混合し、16°Cで30分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-2と称す。

(4) プラスミドpscFUT8gE2-3の構築

実施例4 (2) で得たチャイニーズハムスターFUT8のエクソン2を含むゲノム領域を有するプラスミドpFUT8fgE2-4を用いて、以下の手順でプラスミドpscFUT8gE2-3を構築した (第12図)。

プラスミドpFUT8fgE2-4 2.0 μ gをNEBuffer 1 (New England Biolabs社製) 35 μ lに溶解し、20単位の制限酵素HpaII (New England Biolabs社製) を加えて37°Cで2時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、Blunting High (東洋紡社製) を用い、添付の説明書に従ってDNA末端の平滑化を行った。フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行ってDNA断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 35 μ lに溶解し、20単位の制限酵素HindIII (New England Biolabs社製) を加えて37°Cで2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約3.5KbのDNA断片を精製した。

一方、プラスミドLITMUS39 (New England Biolabs社製) 1.0 μ gをNEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 35 μ lに溶解し、20単位の制限酵素EcoRV (New England Biolabs社製) および20単位の制限酵素HindIII (New England Biolabs社製) を加えて37°Cで2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳

動に供し、約2.8KbのDNA断片を精製した。

上記で得たプラスミドpFUT8fgE2-4由来のHpaII-HindIII断片（約3.5Kb）4.0 μ l、プラスミドLITMUS39由来のEcoRV-HindIII断片（約2.8Kb）1.0 μ l、Ligation High（東洋紡社製）5.0 μ lを混合し、16°Cで30分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。本プラスミドを以下、pscFUT8gE2-3と称す。

(5) プラスミドpKOFUT8gE2-3の構築

実施例4(2)で得たチャイニーズハムスターFUT8のエクソン2を含むゲノム領域を有するプラスミドpFUT8fgE2-4を用いて、以下の手順でプラスミドpKOFUT8gE2-3を構築した（第13図）。

プラスミドpFUT8fgE2-4 2.0 μ gをNEBuffer for EcoRI（New England Biolabs社製）35 μ lに溶解し、20単位の制限酵素EcoRI（New England Biolabs社製）および20単位の制限酵素HindIII（New England Biolabs社製）を加えて37°Cで2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8%（w/v）アガロースゲル電気泳動に供し、約1.8KbのDNA断片を精製した。

一方、プラスミドpBluescriptII KS(+)（Stratagene社製）1.0 μ gをNEBuffer for EcoRI（New England Biolabs社製）35 μ lに溶解し、20単位の制限酵素EcoRI（New England Biolabs社製）および20単位の制限酵素HindIII（New England Biolabs社製）を加えて37°Cで2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8%（w/v）アガロースゲル電気泳動に供し、約3.0KbのDNA断片を精製した。

上記で得たプラスミドpFUT8fgE2-4由来のHindIII-EcoRI断片（約1.8Kb）4.0 μ l、プラスミドpBluescriptII KS(+)由来のHindIII-EcoRI断片（約3.0Kb）1.0 μ l、Ligation High（東洋紡社製）5.0 μ lを混合し、16°Cで30分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-3と称す。

(6) プラスミドpKOFUT8gE2-4の構築

本項(4)および(5)で得たプラスミドpscFUT8gE2-3およびpKOFUT8gE2-3を用いて、以下の手順でプラスミドpKOFUT8gE2-4を構築した（第14図）。

プラスミドpscFUT8gE2-3 1.0 μ gを、100 μ g/ml BSA（New England Biolabs社製）を

含むNEBuffer for SalI (New England Biolabs社製) 35 μ lに溶解し、制限酵素SalI (New England Biolabs社製) 20単位を加えて37°Cで2時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 30 μ lに溶解し、20単位の制限酵素HindIII (New England Biolabs社製) を加えて37°Cで2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約3.6KbのDNA断片を精製した。

一方、プラスミドpKOFUT8gE2-3 1.0 μ gを、100 μ g/ml BSA (New England Biolabs社製) を含むNEBuffer for SalI (New England Biolabs社製) 35 μ lに溶解し、制限酵素SalI (New England Biolabs社製) 20単位を加えて37°Cで2時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 35 μ lに溶解し、20単位の制限酵素HindIII (New England Biolabs社製) を加えて37°Cで2時間消化反応を行った。消化反応後、pH8.0の1mol/l Tris-HCl緩衝液 35 μ lおよび大腸菌C15株由来Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) 3.5 μ lを添加し、65°Cで30分間反応させることによりDNA末端の脱リン酸化を行った。脱リン酸化処理後、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収したDNA断片を滅菌水10 μ lに溶解した。

上記で得たプラスミドpscFUT8gE2-3由来のSalI- HindIII断片 (約3.1Kb) 4.0 μ l、プラスミドpKOFUT8gE2-3由来のSalI- HindIII断片 (約4.8Kb) 1.0 μ l、Ligation High (東洋紡社製) 5.0 μ lを混合し、16°Cで30分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-4と称す。

(7) プラスミドpKOFUT8gE2-5の構築

本項 (3) および (6) で得たプラスミドpKOFUT8gE2-2およびpKOFUT8gE2-4を用いて、以下の手順でプラスミドpKOFUT8gE2-5を構築した (第15図)。

プラスミドpKOFUT8gE2-2 1.0 μ gをNEBuffer 4 (New England Biolabs社製) 30 μ lに溶解し、制限酵素SmaI (New England Biolabs社製) 20単位を加えて25°Cで2時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 30 μ lに溶解し、20単位の制限酵素BamHI (New England Biolabs社製) を加えて37°Cで2時間消化反応を行った。消化反応後、pH8.0の1mol/l Tris-HCl緩衝液30 μ lおよび大腸菌C15株由来Alkaline Phosphatase (宝酒

造社製) 3.0 μ lを添加し、65°Cで1時間反応させることによりDNA末端の脱リン酸化を行った。脱リン酸化処理後、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収したDNA断片を滅菌水 10 μ lに溶解した。

一方、プラスミドpKOFUT8gE2-4 1.0 μ gをNEBuffer 4 (New England Biolabs社製) 30 μ lに溶解し、制限酵素SmaI (New England Biolabs社製) 20単位を加えて25°Cで2時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs社製) 30 μ lに溶解し、20単位の制限酵素BamHI (New England Biolabs社製) を加えて37°Cで2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約5.2KbのDNA断片を精製した。

上記で得たプラスミドpKOFUT8gE2-2由来のSmaI-BamHI断片 (約5.0Kb) 0.5 μ l、プラスミドpKOFUT8gE2-4由来のSmaI-BamHI断片 (約5.2Kb) 4.5 μ l、Ligation High (東洋紡社製) 5.0 μ lを混合し、16°Cで15時間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-5と称す。

(8) プラスミドpKOFUT8Puroの構築

本項 (7) で得たプラスミドpKOFUT8gE2-5を用いて、以下の手順でプラスミドpKOFUT8Puroを構築した (第16図)。

プラスミドpK0SelectDT (Lexicon社製) 1.0 μ gをNEBuffer 4 (New England Biolabs社製) 50 μ lに溶解し、制限酵素RsrII (New England Biolabs社製) 16単位を加えて37°Cで2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、ジフテリアトキシン発現ユニットを含む約1.2KbのDNA断片を精製した。

一方、プラスミドpKOFUT8gE2-5 1.0 μ gをNEBuffer 4 (New England Biolabs社製) 50 μ lに溶解し、制限酵素RsrII (New England Biolabs社製) 16単位を加えて37°Cで2時間消化反応を行った。消化反応後、pH8.0の1mol/l Tris-HCl緩衝液 30 μ lおよび大腸菌C15株由来Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) 3.0 μ lを添加し、65°Cで1時間反応させることによりDNA末端の脱リン酸化を行った。脱リン酸化処理後、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収したDNA断片を滅菌水 10 μ lに溶解した。

上記で得たプラスミドpK0SelectDT由来のRsrII-RsrII断片 (約1.2Kb) 1.0 μ l、プ

ラスミドpKOFUT8gE2-5由来のRsrII-RsrII断片（約10.4Kb）1.0 μ l、滅菌水3.0 μ l、Ligation High（東洋紡社製）5.0 μ lを混合し、16℃で30分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8Puroと称す。該プラスミドはCHO細胞のFUT8遺伝子ノックアウト細胞を作製するためのターゲティングベクターとして用いられる。

実施例6. レクチン耐性CHO/DG44細胞の作製と該細胞を用いた抗体の生産

1. レクチン耐性CHO/DG44株の取得

CHO/DG44細胞を、IMDM-FBS(10) 培地 [ウシ胎児血清 (FBS) を10%、HT supplement (GIBCO BRL社製) を1倍濃度含むIMDM培地] にて接着培養用フラスコ75cm² (グラйнаール社製) 中で培養し、コンフルエント直前まで増殖させた。5mlのダルベッコPBS (インビトロジェン社製) にて細胞を洗浄後、ダルベッコPBSで希釈した0.05%トリプシン (インビトロジェン社製) を1.5ml添加して37℃にて5分間放置し、細胞を培養器底面から剥離させた。剥離させた細胞を通常の細胞培養で行われる遠心操作により回収し、1 \times 10⁵細胞/mlの密度になるようにIMDM-FBS(10) 培地を添加して懸濁後、未添加又は0.1 μ g/mlのアルキル化剤であるN-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (以下、MNNGと表記、Sigma社製) を添加した。CO₂インキュベータ (TABAI製) 内で37℃にて3日間放置後、培養上清を除き、再び上述した操作と同様の操作で細胞を洗浄、剥離、回収し、IMDM-FBS(10) 培地に懸濁後、接着培養用96穴プレート (岩城硝子社製) に1000細胞/ウェルの密度で播種した。各ウェルには培地中終濃度で1mg/mlのレンズマメ凝集素 (Lens culinaris agglutinin; 以下、LCAと表記、Vector社製)、あるいは1mg/mlのヒイロチャワンタケ凝集素 (Aleuria aurantia Lectin; 以下、AALと表記、Vector社製)、あるいは1mg/mlのインゲンマメ凝集素 (Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin; 以下、L-PHAと表記、Vector社製) を添加した。CO₂インキュベータ内で37℃にて2週間培養後、出現したコロニーをレクチン耐性CHO/DG44株として取得した。取得したそれぞれのレクチン耐性CHO/DG44株については、LCA耐性株をCHO-LCA株、AAL耐性株をCHO-AAL株、L-PHA耐性株をCHO-PHA株と名付けた。取得したこれら株の各種レクチンに対する耐性を調べたところ、CHO-LCA株はAALに対しても耐性であり、CHO-AAL株はLCAに対しても耐性であることが分かった。さらに、CHO-LCA株及びCHO-AAL株は、LCAやAALが認識する糖鎖構造と同じ糖鎖構造を認識するレクチン、すなわち、N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6

位とフコースの1位が α 結合で付加された糖鎖構造を認識するレクチンに対しても耐性を示した。具体的には、終濃度1mg/mlのエンドウマメ凝集素 (Pisum sativum Agglutinin; 以下、PSAと表記、Vector社製) が添加された培地でもCHO-LCA株及びCHO-AAL株は耐性を示し生存することが分かった。また、アルキル化剤MNNG無添加の場合でも、上述の処理を施す細胞数を増やすことでレクチン耐性株を取得した。

2. 抗CD20ヒト型キメラ抗体生産細胞の作製

上記1で得られたLCAレクチン耐性株に、抗CD20ヒト型キメラ抗体発現ベクターpKANTEX2B8Pの4 μ gを 1.6×10^6 細胞のCHO/DG44細胞へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、10mlのIMDM-dFBS(10)-HT(1) [dFBS (インビトロジェン社製) を10%、HT supplement (インビトロジェン社製) を1倍濃度で含むIMDM培地 (インビトロジェン社製)] に懸濁し、96ウェル培養用プレート (岩城硝子社製) に100 μ l/ウェルずつ分注した。5% CO₂インキュベーター内で37°C、24時間培養した後、IMDM-dFBS(10) (透析FBSを10%で含むIMDM培地) に培地交換し、1~2週間培養した。HT非依存的な増殖を示す形質転換株のコロニーが出現したため、増殖の認められたウェルの形質転換株については、DHFR遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させた。具体的には、MTXを50nM含むIMDM-dFBS(10) 培地に $1 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/mlになるように懸濁し、24ウェルプレート (岩城硝子社製) に0.5mlずつ分注した。5% CO₂インキュベーター内で37°Cで1~2週間培養して、50nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。増殖が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX濃度を200nMに上昇させ、最終的にMTXを200nMの濃度で含むIMDM-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗CD20ヒト型キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。

3. 抗体発現細胞株の培養及び抗体の精製

上記2. で得られた抗CD20キメラ抗体を高生産するLCAレクチン耐性CHO/DG44形質転換細胞をR92-3-1株と名付けた。R92-3-1株は、平成14年3月26日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6) にFERM BP-7976として寄託されている。

R92-3-1株を、200nM MTX濃度のIMDM-dFBS(10) でコンフルエントになるまで培養し、ダルベッコPBS (インビトロジェン社製) で洗浄後、EX-CELL301 (JRH社製) に培地交換した。5% CO₂インキュベーター内で37°Cで7日間培養して培養上清を回収した。培養上清よりProsep-A (ミリポア社製) カラムを用いて、抗CD20キメラ抗体を精製

した。得られた抗体は、R92-3-1抗体と名付けた。

実施例 7. レクチン耐性CHO/DG44細胞が生産する抗CD20キメラ抗体の精製と活性評価

1. レクチン耐性CHO/DG44細胞由来抗体の結合活性の評価(蛍光抗体法)

上記実施例 6 の 3 項で得られたR92-3-1抗体のCD20発現細胞株Raji細胞に対する結合活性を、実施例2の1項に示した蛍光抗体法にしたがって検討し、通常のCHO細胞由来である市販抗体RituxanTMの活性と比較した。第 17 図に示したように、R92-3-1抗体、RituxanTMともに抗体濃度依存的に蛍光強度の増加が認められ、ほぼ同様の結合活性を示すことが確認された。

2. レクチン耐性CHO/DG44細胞由来抗体のin vitro細胞傷害活性の評価 (ADCC活性)

上記実施例6の 3 項で得られたR92-3-1抗体のin vitro ADCC活性を評価するため、実施例2の2項に示した方法に準じて、ADCC活性を測定した。なお、エフェクター細胞とターゲット細胞であるRaji細胞との比は25:1、最終抗体濃度は0.001~10 μ g/mLとし、全量200 μ Lになるように添加して反応させた。その結果を第 18 図に示した。

LCAレクチン耐性CHO/DG44細胞由来R92-3-1抗体はRituxanTMよりも高いADCC活性を示していた。

3. レクチン耐性CHO/DG44細胞由来抗体の糖鎖解析

上記実施例 6 の 3 項において得られたR92-3-1抗体の糖鎖解析を実施例3に示した方法にしたがって行った。第 19 図にその結果を示した。第 19 図で示されたピーク①~⑧の糖鎖構造は、第 7 図で示されたピーク①~⑧の糖鎖構造と同一である。

第 19 図において、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖群の割合は、①~⑩の各ピークが占める面積の合計のうち①~④、⑨および⑩のピークが占める面積の合計から算出した。また、 α -1,6-フコースが結合した糖鎖群の割合は、①~⑩の各ピークが占める面積の合計のうち⑤~⑧のピークが占める面積の合計から算出した。

その結果、R92-3-1抗体の α -1,6-フコースが結合しない糖鎖含量は33%、 α -1,6-フコース結合糖鎖含量は67%であり、実施例3で糖鎖分析を行ったRituxanTMと比較すると、LCAレクチン耐性CHO/DG44細胞で生産した抗体は α -1,6-フコースが結合しない糖鎖含量が多かった。

実施例 8. CHO細胞由来GMD遺伝子の取得

1. CHO細胞由来GMD cDNA配列の決定

(1) CHO細胞由来GMD遺伝子のcDNA取得 (5' 及び3' 末端配列を除く部分cDNAの取得)

GenBankに登録されているヒトGMD cDNA配列 (GenBank Accession No. AF042377) をクエリーとして、げっ歯類由来GMD cDNAを公的データベース (BLAST) を用いて検索した結果、3種類のマウスEST配列が得られた (GenBank Accession No. BE986856、BF158988、BE284785)。これらEST配列を連結させることにより、推定されるマウスGMD cDNA配列を決定した。

このマウスGMD cDNA配列より、配列番号32で示される塩基配列を有する28merのプライマー、配列番号33で示される塩基配列を有する27merのプライマー、配列番号34で示される塩基配列を有する25merのプライマー、配列番号35で示される塩基配列を有する24merのプライマー、配列番号36で示される塩基配列を有する25merのプライマーを作製した。

続いて、CHO/DG44細胞を37℃の5%CO₂インキュベーター内にて継代後4日間培養した。培養後、Rneasy Protect Mini kit (キアゲン社製) を用いて、各1×10⁷細胞より添付の使用説明書に従ってRT-PCR (GIBCO BRL社製) を用いて、添付の使用説明書に従って各RNA5μgより20μlの反応液中にて一本鎖cDNAを合成した。

該CHO細胞由来cDNAを増幅するために以下の方法でPCRを行なった。CHO細胞由来一本鎖cDNA 0.5μlを鋳型として含む20μlの反応液 [1×EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mMのdNTP's、0.5単位のEX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5μMの合成DNAプライマー2種類] を調製した。なお、合成DNAプライマーには配列番号32と配列番号33、配列番号34と配列番号33、配列番号32と配列番号35、配列番号32と配列番号36の組み合わせを用いた。該反応液をDNAサーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて94℃にて5分間加熱した後、94℃にて1分間、68℃にて2分間のサイクルを30サイクル行なった。

このPCR反応液をアガロース電気泳動にて分画した結果、配列番号32と配列番号33の合成DNAプライマーを用いたPCR産物では約1.2kbp、配列番号33と配列番号34の合成DNAプライマーを用いたPCR産物では約1.1kbp、配列番号32と配列番号35の合成DNAプライマーを用いたPCR産物では約350bp、配列番号32と配列番号36の合成DNAプライマーを用いたPCR産物では約1kbpのDNA断片が増幅された。これらDNA断片をGene Clean II kit (BI0101社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収したDNA断片はDNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いてpT7Blue(R) ベクター (Novagen社製) に連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5株 (東洋紡績社

製)を形質転換し、プラスミド22-8(配列番号32と配列番号33の合成DNAプライマーから増幅された約1.2kbpのDNA断片を有する)、23-3(配列番号34と配列番号33の合成DNAプライマーから増幅された約1.1kbpのDNA断片を有する)、31-5(配列番号32と配列番号35の合成DNAプライマーから増幅された約350bpのDNA断片を有する)、34-2(配列番号32と配列番号36の合成DNAプライマーから増幅された約1kbpのDNA断片を有する)を得た。これらプラスミドに含まれるCHO細胞由来GMD cDNA配列を、DNAシーケンサーABI PRISM 377(パーキンエルマー社製)を用い、常法に従って決定した(5'末端側の開始メチオニンより下流28塩基の配列、及び3'末端側の終了コドンより上流27塩基の配列は合成オリゴDNA配列由来のため、マウスGMD cDNA配列である)。

さらに、プラスミド22-8と34-2に含まれるCHO細胞由来GMD cDNAを組み合わせたプラスミドを作製するため、以下の工程を行った。1 μ gのプラスミド22-8を制限酵素EcoRI(宝酒造社製)で37℃にて16時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約4kbpのDNA断片をGene Clean II kit(BIO101社製)を用い、添付マニュアルに従って回収した。2 μ gのプラスミド34-2を制限酵素EcoRIで37℃にて16時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約150bpのDNA断片をGene Clean II kit(BIO101社製)を用い、添付マニュアルに従って回収した。それぞれ回収したDNA断片を、Calf Intestine Alkaline Phosphatase(宝酒造社製)で末端を脱リン酸化した後、DNA Ligation kit(宝酒造社製)を用いて連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5 α 株(東洋紡績社製)を形質転換し、プラスミドCHO-GMDを得た(第20図)。

(2) CHO細胞由来GMD cDNAの5'末端配列の決定

CHO細胞由来GMD cDNAの5'末端側非コード(non-coding)領域の塩基配列より配列番号37で示される塩基配列を有する24merのプライマー、及びCHO由来GMD cDNA配列より配列番号38で示される塩基配列を有する32merのプライマーを作製し、cDNAを増幅するために以下の方法でPCRを行なった。CHO細胞由来の一本鎖cDNA 0.5 μ lを鋳型として含む20 μ lの反応液[1 \times EX Taq Buffer(宝酒造社製)、0.2mMのdNTP's、0.5単位のEX Taq polymerase(宝酒造社製)、0.5 μ Mの配列番号37と配列番号38の合成DNAプライマー]を調製し、DNAサーマルサイクラー480(パーキンエルマー社製)を用いて、94℃にて5分間加熱した後、94℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて2分間のサイクルを20サイクル行なった後、さらに94℃にて1分間、68℃にて2分間のサイクルを18サイクル行なった。該PCR反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約

300bpのDNA断片をGene Clean II kit (BI0101社製) を用い、添付の説明書に従って回収した。回収したDNA断片はDNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いてpT7Blue(R) ベクター (Novagen社製) に連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5 α 株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド5' GMDを得た。DNAシーケンサー-377 (パーキンエルマー社製) を用い、該プラスミドに含まれるCHO由来GMD cDNAの開始メチオニンより下流28塩基の配列を決定した。

(3) CHO細胞由来GMD cDNAの3' 末端配列の決定

CHO細胞由来GMDの3' 末端cDNA配列を得るため、以下の方法でRACE法を行なった。CHO細胞由来RNAより、3' RACE用一本鎖cDNAの作製をSMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社製) を用い、添付の説明書に従って行なった。ただし、逆転写酵素にはPowerScriptTM Reverse Transcriptase (CLONTECH社製) を用いた。調製後の一本鎖cDNAは、キット添付のTricin-EDTA bufferで10倍に希釈したものをPCRの鋳型として用いた。

続いて、上記3' RACE用一本鎖cDNA 1 μ lを鋳型として含む20 μ lの反応液 [1 \times EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTP's、0.5単位のEX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 μ Mの配列番号39で示す24merの合成DNAプライマー [本項 (1) で決定したCHO細胞由来GMD cDNA配列より作製]、1倍濃度のUniversal Primer Mix (SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit に付属 ; CLONTECH社製)] を調製し、DNAサーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94 $^{\circ}$ Cにて5分間加熱した後、94 $^{\circ}$ Cにて1分間、68 $^{\circ}$ Cにて2分間のサイクルを30サイクル行なった。

反応終了後、該PCR反応液より1 μ lを取り、Tricin-EDTA buffer (CLONTECH社製) で20倍希釈した水溶液1 μ lを鋳型として含む20 μ lの反応液 [1 \times EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTP's、0.5単位のEX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 μ Mの配列番号40で示す25merの合成DNAプライマー [本項 (1) で決定したCHO細胞由来GMD cDNA配列より作製]、0.5 μ MのNested Universal Primer (SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit に付属 ; CLONTECH社製)] を調製し、DNAサーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94 $^{\circ}$ Cにて5分間加熱した後、94 $^{\circ}$ Cにて1分間、68 $^{\circ}$ Cにて2分間のサイクルを30サイクル行なった。

反応終了後、該PCR反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約700bpのDNA断片をGene Clean II kit (BI0101社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収したDNAはDNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いてpT7Blue(R) ベクター (Novagen

社製)に連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5 α 株(東洋紡績社製)を形質転換し、プラスミド3' GMDを得た。DNAシーケンサー377(パーキンエルマー社製)を用い、該プラスミドに含まれるCHO由来GMD cDNAの終止コドンより上流27塩基の配列、及び3'側のnon-coding領域415bpの塩基配列を決定した。

以上、本項(1)、(2)、(3)より決定したCHO由来GMD遺伝子の全長cDNA配列を配列番号41、それに対応するアミノ酸配列を配列番号61に示す。

2. CHO/DG44細胞のGMD遺伝子を含むゲノム配列の決定

実施例8の1項で決定したマウスGMD cDNA配列より、配列番号56で示される塩基配列を有する25merのプライマーを作製した。続いて、以下の方法でCHO細胞由来ゲノムDNAを取得した。CHO/DG44細胞をIMDM-dFBS(10)-HT(1)培地[HT supplement(インビトロジェン社製)を1倍濃度で含むIMDM-dFBS(10)培地]に 3×10^5 細胞/mlになるように懸濁し、接着細胞用平底6穴プレート(Greiner社製)に2ml/ウェルずつ分注した。37℃の5%CO₂インキュベーター内でコンフルエントになるまで培養したのち、該プレートより公知の方法[ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Research), 3, 2303(1976)]に従ってゲノムDNAを調製し、TE-RNase緩衝液(pH8.0)(10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA、200 μ g/ml RNase A) 150 μ lに一晩溶解した。

上記で取得したCHO/DG44細胞由来ゲノムDNAを100ng、20 μ lの反応液[1 \times EX Taq Buffer(宝酒造社製)、0.2mM dNTP's、0.5単位のEX Taq polymerase(宝酒造社製)、0.5 μ Mの配列番号35と配列番号56の合成DNAプライマー]を調製し、DNAサーマルサイクラー480(パーキンエルマー社製)を用いて、94℃にて5分間加熱した後94℃にて1分間、68℃にて2分間のサイクルを30サイクル行なった。反応終了後、該反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約100bpのDNA断片をGene Clean II kit(BIO101社製)を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収したDNA断片はDNA Ligation kit(宝酒造社製)を用いてpT7Blue(R)ベクター(Novagen社製)に連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5 α 株(東洋紡績社製)を形質転換し、プラスミドex3を得た。DNAシーケンサー377(パーキンエルマー社製)を用いて該プラスミドに含まれるCHO細胞由来ゲノムDNAの塩基配列を決定した。決定した塩基配列を配列番号57に示す。

次に、実施例8の1項で決定したCHO細胞由来GMD cDNA配列より、配列番号58で示される塩基配列を有する25merのプライマー、及び配列番号59で示される塩基配列を有する25merのプライマーを作製した。続いて、CHO/DG44由来ゲノムDNAを100ng、20

μ 1の反応液 [1×EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTP's、0.5単位のEX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 μ Mの配列番号58と配列番号59の合成DNAプライマー] を調製し、DNAサーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94℃にて5分間加熱した後、94℃にて1分間、68℃にて2分間のサイクルを30サイクル行なった。

反応終了後、該反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約200bpのDNA断片をGene Clean II kit (BI0101社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収したDNA断片はDNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いてpT7Blue(R) ベクター (Novagen社製) に連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5 α 株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミドex4を得た。DNAシーケンサー377 (パーキンエルマー社製) を用いて該プラスミドに含まれるCHO細胞由来ゲノムDNAの塩基配列を決定した。決定した塩基配列を配列番号60に示す。

実施例 9. CHO細胞由来の糖鎖合成に係わる各種酵素遺伝子の取得

1. CHO細胞のFx cDNA配列の決定

(1) CHO/DG44細胞由来全RNAの抽出

CHO/DG44細胞を10% ウシ胎児血清 (Life Technologies社製) および1倍濃度のHT supplement (Life Technologies社製) を添加したIMDM培地 (Life Technologies社製) に懸濁し、 2×10^5 個/mlの密度で接着細胞培養用T75フラスコ (Greiner社製) に15ml播種した。37℃の5%CO₂インキュベーター内で培養し、培養2日目に 1×10^7 個を回収後、RNAeasy (QIAGEN社製) により添付の説明書に従って全RNAを抽出した。

(2) CHO/DG44細胞由来一本鎖cDNAの調製

上記 (1) で調製した全RNAを45 μ lの滅菌水に溶解し、RQ1 RNase-Free DNase (Promega社製) 1 μ l、付属の10×DNase buffer 5 μ l、RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega社製) 0.5 μ lをそれぞれに添加して、37℃で30分間反応させることにより、試料中に混入したゲノムDNAを分解した。反応後、RNAeasy (QIAGEN社製) により全RNAを再精製し、50 μ lの滅菌水に溶解した。

得られた全RNA3 μ lに対しSUPERScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ (dT) をプライマーとした20 μ lの系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖cDNAを合成した。GFPPおよびFxのクローニングには該反応液の50倍希釈水溶液を使用した。使用するまで-80℃で保管した。

(3) チャイニーズハムスターFxのcDNA部分断片の取得

以下の手順によりチャイニーズハムスターFxのcDNA部分断片を取得した。

まず公的データベースに登録されているヒトFxのcDNA (Genebank 登録番号U58766) およびマウスのcDNA (Genebank 登録番号M30127) に共通の塩基配列に対して特異的なプライマー (配列番号42および配列番号43に示す) を設計した。

次にDNAポリメラーゼExTaq (宝酒造社製) を用いて、本項 (2) で調製したCHO/DG44由来一本鎖cDNAを1 μ lを含む25 μ lの反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTPs、0.5 μ mol/l上記遺伝子特異的プライマー (配列番号42および配列番号43)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCRは94°Cで5分間の加熱の後、94°Cで1分間、58°Cで2分間、72°Cで3分間からなる反応を1サイクルとして30サイクルの後、さらに72°Cで10分間加熱する条件で行った。

PCR後、反応液を2%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片301bpをQiaexII Gel Extraction kit (キアゲン社製) を用いて精製し、滅菌水20 μ lで溶出した (以下、アガロースゲルからのDNA断片の精製にはこの方法を用いた)。上記増幅断片4 μ lをTOPO TA cloning kit (invitrogen社製) の説明書に従って、プラスミドpCR2.1へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌DH5 α をコーエンらの方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A)、69, 2110 (1972)] (以下、大腸菌の形質転換にはこの方法を用いた) により形質転換した。

得られた複数のカナマイシン耐性コロニーから、公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 7, 1513 (1979)] (以下、プラスミドの単離方法にはこの方法を用いた) に従って、プラスミドDNAを単離し、Fx cDNA部分断片が組み込まれた2クローンを得た。各々pCRFXクローン8、pCRFXクローン12と称す。

Fxクローン8、Fxクローン12に挿入されたcDNAの塩基配列はDNAシーケンサー377 (Applied Biosystems社製) およびBig Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。本法により配列決定した挿入cDNAがチャイニーズハムスターのFxのオープンリーディングフレーム (ORF) 部分配列をコードすることを確認した。

(4) RACE用一本鎖cDNAの合成

本項 (1) で抽出したCHO/DG44 全RNAからの5' および3' RACE用一本鎖cDNAの作製を

、SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社製) を用いて行った。方法は添付の説明書に従った。ただしPowerScript™ Reverse Transcriptase (CLONTECH社製) を逆転写酵素として用いた。調製後の一本鎖cDNAは各々、キット添付のTricin-EDTA buffer で10倍に希釈したものをPCRの鋳型として用いた。(5) RACE法によるチャイニーズハムスターFx全長cDNAの決定

上記 (3) 項で決定したチャイニーズハムスターFxの部分配列をもとにチャイニーズハムスターFx に特異的な5' RACE用プライマーFXGSP1-1 (配列番号44) およびFXGSP1-2 (配列番号45)、チャイニーズハムスターFx 特異的な3' RACE用プライマーFXGSP2-1 (配列番号46) およびFXGSP2-2 (配列番号47) を設計した。

次にAdvantage2 PCR Kit (CLONTECH社製) を用いて、本項 (4) で調製したCHO/DG44由来RACE用一本鎖cDNAを1 μ lを含む50 μ lの反応液 [Advantage 2 PCR buffer (CLONTECH社製)、0.2mM dNTPs、0.2 μ mol/l チャイニーズハムスターFx特異的RACE用プライマー、1倍濃度の共通プライマー (CLONTECH社製)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。

PCRは94℃で5秒間、68℃で10秒間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして20サイクル繰り返す条件で行った。

反応終了後、反応液より1 μ lをとりTricin-EDTA bufferで50倍に希釈した水溶液1 μ lをテンプレートとして使用し、再度反応液を調製し、同条件でPCRを行った。一回目および2回目のPCRで用いたプライマーの組み合わせおよび増幅されるDNA断片長を第2表に示した。

第2表

チャイニーズハムスターFxcDNA RACE PCRに用いた
プライマーの組み合わせとPCR産物の長さ

5' RACE	FX特異的プライマー	共通プライマー	PCR増幅産物のサイズ
一回目	FXGSP1-1	UPM (Univarsal primer mix)	
二回目	FXGSP1-2	NUP (Nested Univarsal primer)	300bp

3' RACE	FX特異的プライマー	共通プライマー	PCR増幅産物のサイズ
一回目	FXGSP2-1	UPM (Univarsal primer mix)	
二回目	FXGSP2-2	NUP (Nested Univarsal primer)	1100bp

PCR後、反応液を1%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の特異的増幅断片を QiaexII Gel Extraction kit (キアゲン社製) を用いて精製し、滅菌水20 μ lで溶出した。上記増幅断片4 μ lをTOPO TA cloning kit (invitrogen社製) の説明書に従って、プラスミドpCR2.1へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌DH5 α を形質転換した。

得られた複数のカナマイシン耐性コロニーから、プラスミドDNAを単離し、チャイニーズハムスターFxの5'領域を含むcDNAを6クローンを得た。各々をFx5'クローン25、Fx5'クローン26、Fx5'クローン27、Fx5'クローン28、Fx5'クローン31、Fx5'クローン32と称す。

同様にチャイニーズハムスターFxの3'領域を含むcDNAを5クローンを得た。各々Fx3'をFx3'クローン1、Fx3'クローン3、Fx3'クローン6、Fx3'クローン8、Fx3'クローン9と称す。

上記、5'および3' RACEにより取得した各クローンのcDNA部分の塩基配列は、DNAシーケンサー377 (Applied Biosystems社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。本法より決定した各cDNAの塩基配列を比較し、PCRに伴う塩基の読み誤りを除き、チャイニーズハムスターFxcDNA全長の塩基配列を決定した。決定した塩基配列を配列番号48に示す。配列番号48のORFは、塩基番号95~1060であり、終止コドンを除く塩基番号95~1057に対応するアミノ酸配列を配列番号62に示す。

2. CHO細胞のGFPP cDNA配列の決定

(1) チャイニーズハムスターGFPPのcDNA部分断片の取得

以下の手順によりチャイニーズハムスターGFPPのcDNA部分断片を取得した。
まず公的データベースに登録されているヒトGFPPのcDNA (Genebank 登録番号AF017445)、該配列と相同性の高いマウスEST配列 (Genebank 登録番号AI467195、AA422658、BE304325、AI466474)、およびRat EST配列 (Genebank 登録番号BF546372、AI058400、AW144783) の塩基配列を比較し、3種間で保存性の高い領域にラットGFPPに特異的なプライマーGFPP FW9およびGFPP RV9 (配列番号49および配列番号50) を設計した。

次にDNAポリメラーゼExTaq (宝酒造社製) を用いて、本項1 (2) で調製したCH0/DG44由来一本鎖cDNAを1 μ lを含む25 μ lの反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTPs、0.5 μ mol/l上記GFPP特異的プライマーGFPP FW9およびGFPP RV9 (配列番号49および配列番号50)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCRは94°Cで5分間の加熱の後、94°Cで1分、58°Cで2分間、72°Cで3分間からなる反応を1サイクルとして30サイクルの後、さらに72°Cで10分間加熱する条件で行った。

PCR後、反応液を2%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片1.4KbpをQiaexII Gel Extraction kit (キアゲン社製) を用いて精製し、滅菌水20 μ lで溶出した。上記増幅断片4 μ lをTOPO TA cloning kit (invitrogen社製) の説明書に従って、プラスミドpCR2.1へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌DH5 α を形質転換した。

得られた複数のカナマイシン耐性コロニーから、プラスミドDNAを単離し、GFPP cDNA部分断片が組み込まれた3クローンを得た。各々GFPPクローン8、GFPPクローン11、GFPPクローン12と称す。

GFPPクローン8、GFPPクローン11、GFPPクローン12に挿入されたcDNAの塩基配列はDNAシーケンサー377 (Applied Biosystems社製) およびBig Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。本法により配列決定した挿入cDNAがチャイニーズハムスターのGFPPのオープンリーディングフレーム (ORF) の部分配列をコードすることを確認した。

(2) RACE法によるチャイニーズハムスターGFPP全長cDNAの決定

本項2 (1) で決定したチャイニーズハムスターFxの部分配列をもとにチャイニーズハムスターFx に特異的な5' RACE用プライマーGFPP GSP1-1 (配列番号52) およびGFPP GSP1-2 (配列番号53)、チャイニーズハムスターGFPP 特異的な3' RACE用プライマーGFPP GSP2-1 (配列番号54) およびGFPP GSP2-2 (配列番号55) を設計した。

次にAdvantage2 PCR Kit (CLONTECH社製) を用いて、本項 (4) で調製したCHO/DG44由来RACE用一本鎖cDNA1 μ lを含む50 μ lの反応液 [Advantage2 PCR buffer (CLONTECH社製)、0.2mM dNTPs、0.2 μ mol/l チャイニーズハムスターGFPP特異的RACE用プライマー、1倍濃度の共通プライマー (CLONTECH社製)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。

PCRは94℃で5秒間、68℃で10秒間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして20サイクル繰り返す条件で行った。

反応終了後、反応液より1 μ lをとりTricin-EDTA bufferで50倍に希釈した水溶液1 μ lをテンプレートとして、再度反応液を調製し、同条件でPCRを行った。一回目および2回目のPCRで用いたプライマーの組み合わせおよび増幅されるDNA断片長を第3表に示した。

第3表			
チャイニーズハムスターGFPP cDNA RACE PCRに用いた			
プライマーの組み合わせと PCR 産物の長さ			
5' RACE	GFPP 特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	GFPPGSP1-1	UPM (Univarsal primer mix)	
二回目	GFPPGSP1-2	NUP (Nested Univarsal primer)	1100bp
3' RACE	GFPP 特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	GFPPGSP2-1	UPM (Univarsal primer mix)	
二回目	GFPPGSP2-2	NUP (Nested Univarsal primer)	1400bp

PCR後、反応液を1%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の特異的増幅断片をQiaexII Gel Extraction kit (キアゲン社製) を用いて精製し、滅菌水20 μ lで溶出した。上記増幅断片4 μ lをTOPO TA cloning kit (invitrogen社製) の説明書に従って、プラスミドpCR2.1へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌DH5 α を形質転換した。

得られた複数のカナマイシン耐性コロニーから、プラスミドDNAを単離し、チャイニーズハムスターGFPPの5' 領域を含むcDNAを4クローンを得た。各々をGFPP5' クローン1、GFPP5' クローン2、GFPP5' クローン3、GFPP5' クローン4と称す。

同様にチャイニーズハムスターGFPPの3' 領域を含むcDNAを3クローンを得た。各

々をGFPP3' クローン10、GFPP3' クローン16、GFPP3' クローン20と称す。

上記、5' および3' RACEにより取得した各クローンのcDNA部分の塩基配列は、DNAシーケンサー377 (Applied Biosystems社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。塩基配列決定後、各cDNAの塩基配列を比較し、PCRに伴う塩基の読み誤りを除き、チャイニーズハムスターGFPP cDNA全長の塩基配列を決定した。決定した塩基配列を配列番号51に示す。配列番号51のORFは、塩基番号27~1799であり、終止コドンを除く塩基番号27~1796に対応するアミノ酸配列を配列番号63に示す。

実施例10 α -1, 6-フコースを持たない糖鎖が結合した抗体分子の割合の異なる抗CD20キメラ抗体の活性評価

1. α -1, 6-フコースを持たない糖鎖が結合した抗体分子の割合の異なる抗CD20キメラ抗体の調製

実施例1の3項で精製したKM3065と、CHO細胞由来のRituxanTMを用い、KM3065 : RituxanTM = 24 : 66、34 : 56、44 : 46の割合で混合した。これらの試料を実施例3の方法にしたがって糖鎖分析を行なった。 α -1, 6-フコースを持たない糖鎖が結合した抗体分子の割合は、それぞれ26%、35%、44%であった。以下、これらの試料を抗CD20キメラ抗体(26%)、抗CD20キメラ抗体(35%)、抗CD20キメラ抗体(44%)と表記する。第21図には、各試料の糖鎖分析の結果を示した。

2. CD20発現細胞株に対する結合活性の評価(蛍光抗体法)

実施例10の1項で調製した3種類の α -1, 6-フコースを持たない糖鎖が結合した抗体分子の割合の異なる抗CD20キメラ抗体に、実施例3で糖鎖分析を行ったKM3065及びRituxanTM(それぞれ抗CD20キメラ抗体(96%)、抗CD20キメラ抗体(6%)と表記する)を加えた5種類の抗体の結合活性を実施例2の1項に示した蛍光抗体法にしたがって測定した。第22図に示したように、抗体濃度0.016~2 μ g/mLにおいていずれの抗体もCD20陽性Raji細胞(JCRB9012)に対してほぼ同等の結合活性を示し、 α -1, 6-フコースを持たない糖鎖が結合した抗体分子の割合は、抗体の抗原結合活性に影響を与えないことが明らかとなった。

3. CD20発現細胞株に対する細胞傷害活性の評価(⁵¹Crリリース法)

CD20陽性であるヒトBリンパ球細胞株WIL2-S(ATCC CRL8885)に対するADCC活性を、健常人ドナーAから採取したエフェクター細胞を用いて、以下のようにして測定した。

(1) 標的細胞溶液の調製

WIL2-S細胞の 2×10^6 細胞を調製し、放射性物質である $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を3.7MBq当量加えて37°Cで1時間反応させ、細胞を放射標識した。反応後、RPMI1640-FCS(10)培地を用いた懸濁及び遠心分離操作により3回洗浄し、培地に再懸濁し、4°Cで30分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、培地を10mL加え、 2×10^5 細胞/mLに調製し、標的細胞溶液とした。

(2) ヒトエフェクター細胞溶液の調製

健常人末梢血50mLを採取し、ヘパリンナトリウム（清水製薬社製）を0.5mLを加え穏やかに混ぜた。これをLymphoprep（AXIS SHIELD社製）を用いて使用説明書に従い、遠心分離（800g、20分間）して単核球層を分離した。培地で3回遠心分離（1400rpm、5分間）して洗浄後、培地を用いて 2×10^6 細胞/mLの濃度で再懸濁し、ヒトエフェクター細胞溶液とした。

(3) ADCC活性の測定

96ウェルU字底プレート（Falcon社製）の各ウェルに（1）で調製した標的細胞溶液の50 μL （ 1×10^4 細胞/ウェル）を分注した。次いで（2）で調製したヒトエフェクター細胞溶液を100 μL （ 2×10^5 細胞/ウェル、ヒトエフェクター細胞と標的細胞の比は20:1となる）添加した。さらに、各種 α -1,6-フコースを持たない糖鎖が結合した抗体分子の割合の異なる抗CD20キメラ抗体を各最終濃度0.001~1 $\mu\text{g/mL}$ となるように加え、37°Cで4時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の ^{51}Cr 量を γ -カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、ヒトエフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清中の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液とヒトエフェクター細胞溶液の代わりに1mol/Lの塩酸溶液を添加し、上記と同様の操作を行い、上清中の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。細胞傷害活性（%）は下式により求めた。

$$\text{細胞傷害活性 (\%)} = \frac{\text{検体上清中の}^{51}\text{Cr量} - \text{自然解離}^{51}\text{Cr量}}{\text{全解離}^{51}\text{Cr量} - \text{自然解離}^{51}\text{Cr量}} \times 100$$

第23図には、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖が結合した抗体分子の割合の異なる抗CD20キメラ抗体の各種濃度（0.001~1 $\mu\text{g/mL}$ ）におけるADCC活性を健常人ドナーAのエフェクター細胞を用いて上記の方法により測定した結果を示した。第23図に

示したように、抗CD20キメラ抗体のADCC活性は、いずれの抗体濃度においても、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖が結合した抗体分子の割合が増加すると上昇する傾向を示した。抗体濃度が低ければ、ADCC活性は低下する。抗体濃度が $0.01 \mu\text{g/mL}$ では、 α -1,6-フコースが結合しない糖鎖が26%、35%、44%及び96%の抗体はほぼ同様の高いADCC活性を示したが、 α -1,6-フコースが結合しない糖鎖が6%の抗体ではADCC活性は低かった。

4. CD20発現細胞株に対するADCC活性の評価(LDH法)

Raji細胞に対するADCC活性を、実施例2の2項に示したLDH(乳酸デヒドロゲナーゼ)活性測定法により、健常人ドナーBより採取したエフェクター細胞を用いて評価した。エフェクター細胞と標的細胞の比は20:1、最終抗体濃度は $0.0001 \sim 1 \mu\text{g/mL}$ とし、全量 $200 \mu\text{L}$ になるように添加して、 37°C で4時間反応させた後、実施例2の2項にしたがって、測定を行った。第24図には、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖が結合した抗体分子の割合の異なる抗CD20キメラ抗体の各種濃度($0.0001 \sim 1 \mu\text{g/mL}$)におけるADCC活性を健常人ドナーBのエフェクター細胞を用いて測定した結果を示した。第24図に示したように、抗CD20キメラ抗体のADCC活性は、いずれの抗体濃度においても、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖が結合した抗体分子の割合が増加すると上昇する傾向を示した。抗体濃度が低ければ、ADCC活性は低下する。抗体濃度が $0.01 \mu\text{g/mL}$ では、 α -1,6-フコースが結合しない糖鎖が26%、35%、44%及び96%の抗体は高いADCC活性を示したが、 α -1,6-フコースが結合しない糖鎖が6%の抗体ではADCC活性は低かった。

第23図および第24図の結果は、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖が結合した抗体分子の割合に応じてADCC活性が上昇すること、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖が結合した抗体分子の割合が約20%以上の抗体組成物は、十分高いADCC活性を有することを示し、ヒトエフェクター細胞のドナーまたは標的細胞が異なっても同様の結果が得られた。

実施例11：バイセクティングGlcNAcを持つ糖鎖が結合した抗体分子の割合の異なる抗CD20キメラ抗体の活性評価

(1) レクチンクロマトグラフィーによる抗CD20キメラ抗体の分離

バイセクティングGlcNAcを持つ糖鎖に親和性があるレクチンが固定化されたカラムを用いて、実施例1の3項で精製した抗CD20キメラ抗体KM3065を分離した。

精製された抗CD20キメラ抗体KM3065を含む溶液をレクチンカラム(LA-PHA-E₄、4.6

×150mm、ホーネンコーポレーション社製)に通塔した。HPLCシステムとしてはShimadzu社製LC-6Aを用い、流速0.5ml/分、カラム温度は室温にてレクチンクロマトグラフィーを行った。50mMトリス-硫酸緩衝液(pH8.0)でカラムを平衡化し、精製されたKM3065を含む溶液を注入後、50mMトリス-硫酸緩衝液(pH8.0)中0Mから58mMへの四ほう酸カリウム($K_2B_4O_7$ 、ナカライテスク社製)によるリニアグラジエント(35分間)にて溶出した。その後5分間四ほう酸カリウム濃度を100mMに維持し、その後さらに50mMトリス-硫酸緩衝液(pH8.0)を20分間通塔することにより、抗CD20キメラ抗体KM3065を、9～14分、14～17分、17～22分、22～34分に溶出した4つの画分(画分①～④)に分離した(第25図)。

(2) 糖鎖分析

前項で分離した4つの画分(画分①～④)と分離前の抗CD20キメラ抗体KM3065の糖鎖分析を、実施例3に示す方法で行った。PA化糖鎖群は、15分から45分の範囲に溶出した。各PA化糖鎖のピーク面積の合計に占める、バイセクティングGlcNAcを持つ糖鎖の割合を算出した結果、分離前の抗CD20キメラ抗体KM3065の該糖鎖の割合は20%であるのに対し、画分①:0%、画分②:8%、画分③:33%、画分④:45%であった(第26図)。α-1,6-フコースを持たない糖鎖が結合した抗体分子の割合はそれぞれ分離前の抗CD20キメラ抗体KM3065:96%、画分①:93%、画分②:94%、画分③:92%、画分④:90%であった。以上の結果から、バイセクティングGlcNAcを持つ糖鎖に親和性があるレクチンが固定化されたカラムを用いて、α-1,6-フコースを持たない糖鎖が結合した抗体分子の割合がほぼ均一であり、かつバイセクティングGlcNAcを持つ糖鎖が結合した抗体分子の割合の異なる抗CD20キメラ抗体が調製されたことを確認した。

(3) in vitro細胞傷害活性(ADCC活性)の測定 レクチンクロマトグラフィーによって分離した4つの画分(画分①～④)、ならびに分離前の抗CD20キメラ抗体KM3065のin vitro細胞傷害活性(ADCC活性)測定を、実施例2の2項に示す方法で行った(第27図)。その結果、レクチンクロマトグラフィーによって分離した4つの画分は、分離前の抗CD20キメラ抗体KM3065とほぼ同じ強さのADCC活性を示した。α-1,6-フコースを持たない糖鎖が結合した抗体分子の割合は前項の結果から90%～96%とほぼ均一であり、α-1,6-フコースを持たない糖鎖が結合した抗体分子がADCC活性に与える影響はほぼ同じであると考えられた。α-1,6-フコースを持たない糖鎖が結合した抗体分子の割合が高くADCC活性が高い抗体に、更にバイセクティングGlcNAcを

付加してもADCC活性の強さは増強しなかった。すなわち、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖が結合した割合の高い抗体はバイセクティングGlcNAcの有無には関係なく、 α -1,6-フコースを持つ糖鎖が結合した割合の高い抗体に比べてADCC活性が高いことが分かった。

産業上の利用可能性

本発明によりCD20に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる組成物、該抗体組成物を生産する細胞またはトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、該抗体組成物の製造方法および該抗体組成物を含有する医薬が提供される。

請求の範囲

1. CD20に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が20%以上である抗体組成物を生産する細胞。

2. フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの1位がN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位に α 結合していない糖鎖である、請求項1に記載の細胞。

3. 細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失した請求項1または2に記載の細胞。

4. 細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素が、以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選ばれる酵素である、請求項3に記載の細胞。

- (a) GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase) ;
- (b) Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase) ;
- (c) GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase) 。

5. GMDが、以下の(a)または(b)であるDNAがコードする蛋白質である、請求項4に記載の細胞。

- (a) 配列番号41で表される塩基配列からなるDNA ;
- (b) 配列番号41で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGMD活性を有する蛋白質をコードするDNA。

6. GMDが、以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選ばれる蛋白質である、請求項4に記載の細胞。

- (a) 配列番号61で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;
- (b) 配列番号61で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGMD活性を有する蛋白質。
- (c) 配列番号61で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGMD活性を有する蛋白質。

7. Fxが、以下の (a) または (b) であるDNAがコードする蛋白質である、請求項4に記載の細胞。

- (a) 配列番号48で表される塩基配列からなるDNA；
- (b) 配列番号48で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつFx活性を有する蛋白質をコードするDNA。

8. Fxが、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求項4に記載の細胞。

- (a) 配列番号62で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (b) 配列番号62で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつFx活性を有する蛋白質；
- (c) 配列番号62で表されるアミノ酸配列と 80 %以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつFx活性を有する蛋白質。

9. GFPPが、以下の (a) または (b) であるDNAがコードする蛋白質である、請求項4に記載の細胞。

- (a) 配列番号51で表される塩基配列からなるDNA；
- (b) 配列番号51で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGFPP活性を有する蛋白質をコードするDNA。

10. GFPPが、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求項 4 に記載の細胞。

- (a) 配列番号63で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (b) 配列番号63で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGFPP活性を有する蛋白質；
- (c) 配列番号63で表されるアミノ酸配列と 80 %以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGFPP活性を有する蛋白質。

11. N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が α -1, 6-フコシルトランスフェラーゼである、請求項 3 に記載の細胞。

12. α -1, 6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c) 及び(d) からなる群から選ばれるDNAがコードする蛋白質である、請求項11に記載の細胞。

- (a) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNA；
- (b) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNA；
- (c) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA；
- (d) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

13. α -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 及び(f) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求項11に記載の細胞。

- (a) 配列番号23で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (b) 配列番号24で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (c) 配列番号23で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (d) 配列番号24で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (e) 配列番号23で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (f) 配列番号24で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

14. 酵素の活性が、以下の (a)、(b)、(c)、(d) 及び (e) からなる群から選ばれる手法により低下または欠失した、請求項3～13のいずれか1項に記載の細胞。

- (a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；
- (b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；
- (c) 酵素についての突然変異を導入する手法；
- (d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法；
- (e) N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法。

15. 少なくともN-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位

とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である請求項1～14のいずれか1項に記載の細胞。

16. 細胞が、下記の(a)～(j)からなる群から選ばれる細胞である、請求項1～15のいずれか1項に記載の細胞。

- (a) チャイニーズハムスター卵巢組織由来CHO細胞；
- (b) ラットミエローマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞；
- (c) マウスミエローマ細胞株NS0細胞；
- (d) マウスミエローマ細胞株SP2/0-Ag14細胞；
- (e) シリアンハムスター腎臓組織由来BHK細胞；
- (f) サルCOS細胞；
- (g) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞；
- (h) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
- (i) 胚性幹細胞；
- (j) 受精卵細胞。

17. CD20に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が20%以上である抗体組成物を生産する、該抗体分子をコードする遺伝子を導入したトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

18. フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの1位がN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位に α 結合していない糖鎖である、請求項17に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

19. 細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下するように、ゲノムが改変された請求項17または18に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

20. 細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の遺伝子またはN-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子がノックアウトされた請求項17また

は 18 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

21. 細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素が、以下の(a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる酵素である、請求項 19 または 20 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

- (a) GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase) ;
- (b) Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase) ;
- (c) GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase) 。

22. GMDが、以下の (a) または (b) であるDNAがコードする蛋白質である、請求項 21 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

- (a) 配列番号41で表される塩基配列からなるDNA ;
- (b) 配列番号41で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGMD活性を有する蛋白質をコードするDNA。

23. Fxが、以下の (a) または (b) であるDNAがコードする蛋白質である、請求項 21 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

- (a) 配列番号48で表される塩基配列からなるDNA ;
- (b) 配列番号48で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつFx活性を有する蛋白質をコードするDNA。

24. GFPPが、以下の (a) または (b) であるDNAがコードする蛋白質である、請求項 21 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

- (a) 配列番号51で表される塩基配列からなるDNA ;
- (b) 配列番号51で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGFPP活性を有する蛋白質をコードするDNA。

25. N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が α -1, 6-フコシルトランスフェラーゼである、請求項 19 または 20 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

26. α -1, 6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c) 及び (d) からなる群から選ばれるDNAがコードする蛋白質である、請求項 25 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

- (a) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNA ;
- (b) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNA ;

(c) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA；

(d) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

27. トランスジェニック非ヒト動物が、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル及びウサギからなる群から選ばれる動物である、請求項17～26のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

28. 抗体分子が、以下の(a)、(b)、(c)及び(d)からなる群から選ばれる分子である、請求項1～16のいずれか1項に記載の細胞。

(a) ヒト抗体；

(b) ヒト化抗体；

(c) (a)または(b)のFc領域を含む抗体断片；

(d) (a)または(b)のFc領域を有する融合蛋白質。

29. 抗体分子のクラスがIgGである、請求項1～16および28のいずれか1項に記載の細胞。

30. 抗体分子の軽鎖可変領域の相補性決定領域1、相補性決定領域2、相補性決定領域3が配列番号5、6、7、および／または重鎖可変領域の相補性決定領域1、相補性決定領域2、相補性決定領域3が配列番号8、9、10で示されるアミノ酸配列を含む請求項1～16、28および29のいずれか1項に記載の細胞。

31. 抗体分子の軽鎖可変領域が配列番号12、および／または重鎖可変領域が配列番号14に記載のアミノ酸配列を含む請求項1～16、28、29および30のいずれかに1項に記載の細胞。

32. 抗体分子が、以下の(a)、(b)、(c)及び(d)からなる群から選ばれる分子である、請求項17～27のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) ヒト抗体；

(b) ヒト化抗体；

(c) (a)または(b)のFc領域を含む抗体断片；

(d) (a)または(b)のFc領域を有する融合蛋白質。

33. 抗体分子のクラスがIgGである、請求項17～27および32のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

34. 抗体分子の軽鎖可変領域の相補性決定領域1、相補性決定領域2、相補性決定領域3がそれぞれ配列番号5、6、7、および／または重鎖可変領域の相補性決定領域1、相補性決定領域2、相補性決定領域3がそれぞれ配列番号8、9、10で示されるアミノ酸配列を含む請求項17～27、32および33のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

35. 抗体分子の軽鎖可変領域が配列番号12、および／または重鎖可変領域が配列番号14に記載のアミノ酸配列を含む請求項17～27、32、33および34のいずれかに1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

36. 請求項1～16、28～31のいずれか1項に記載の細胞により生産された抗体組成物。

37. 請求項17～27、32～35のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫を飼育し、飼育した動物あるいは植物により生産された抗体組成物。

38. CD20に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が20%以上である抗体組成物。

39. フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの1位がN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位に α 結合していない糖鎖である、請求項38に記載の抗体組成物。

40. 抗体分子が、以下の(a)、(b)、(c)及び(d)からなる群から選ばれる分子である、請求項38項に記載の抗体組成物。

(a) ヒト抗体；

(b) ヒト化抗体；

(c) (a)または(b)のFc領域を含む抗体断片；

(d) (a)または(b)のFc領域を有する融合蛋白質。

41. 抗体分子のクラスがIgGである、請求項38～40のいずれか1項に記載の

抗体組成物。

42. 抗体分子の軽鎖可変領域の相補性決定領域1、相補性決定領域2、相補性決定領域3がそれぞれ配列番号5、6、7、および／または重鎖可変領域の相補性決定領域1、相補性決定領域2、相補性決定領域3がそれぞれ配列番号8、9、10で示されるアミノ酸配列を含む請求項38～41のいずれか1項に記載の抗体組成物。

43. 抗体分子の軽鎖可変領域が配列番号12、および／または重鎖可変領域が配列番号14に記載のアミノ酸配列を含む請求項38～42のいずれかに1項に記載の抗体組成物。

44. 請求項1～16、28～31のいずれか1項に記載の細胞を培地に培養し、培養物中に請求項36、38～43のいずれか1項に記載の抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物から該抗体組成物を採取する工程を含む、該抗体組成物を製造する方法。

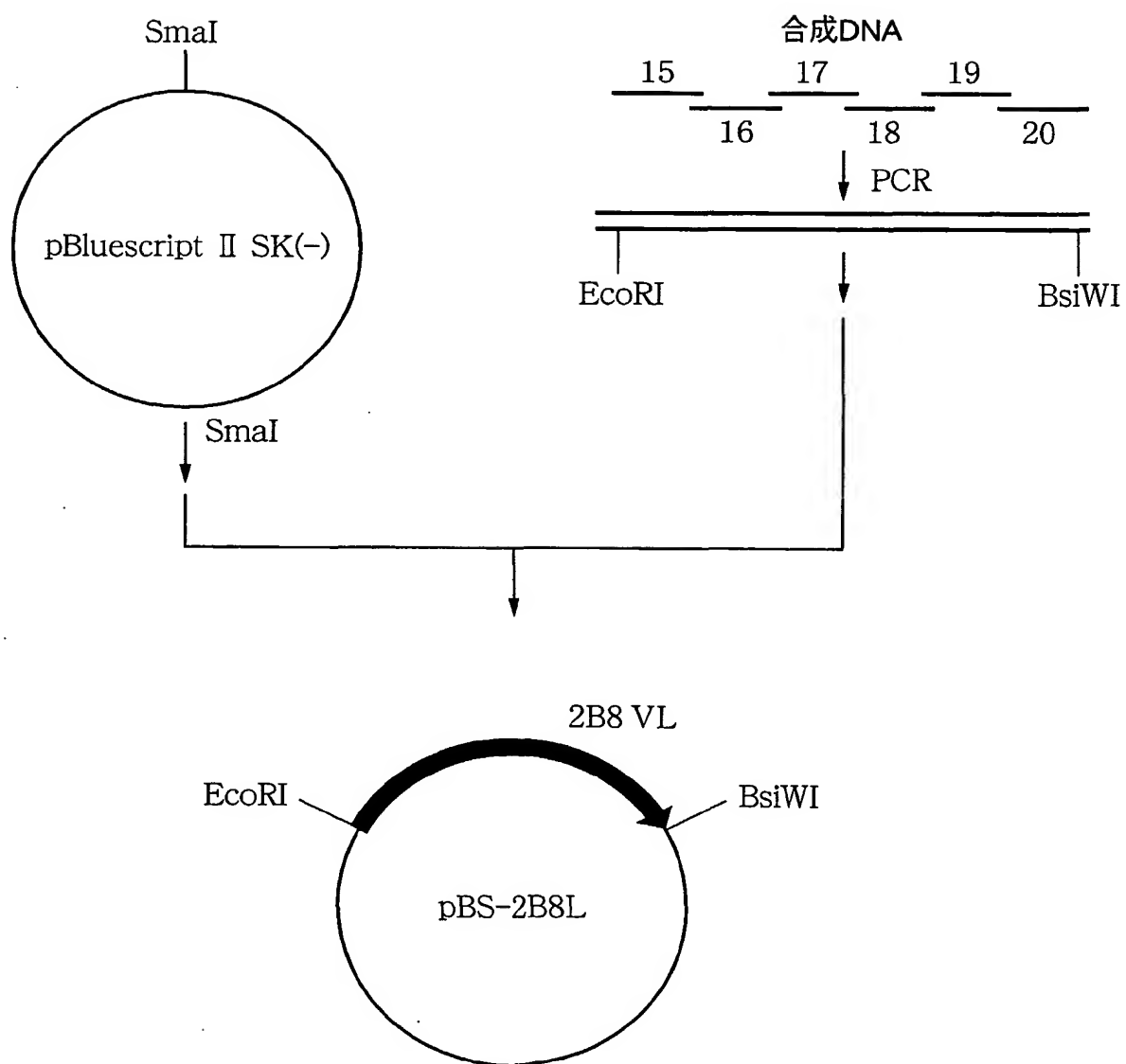
45. 請求項17～27、32～35のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫を飼育し、飼育した動物あるいは植物から組織あるいは体液を取得し、取得した組織あるいは体液から請求項36、38～43のいずれか1項に記載の抗体組成物を採取する工程を含む、該抗体組成物を製造する方法。

46. 請求項36～43いずれか1項に記載の抗体組成物を有効成分として含有する医薬。

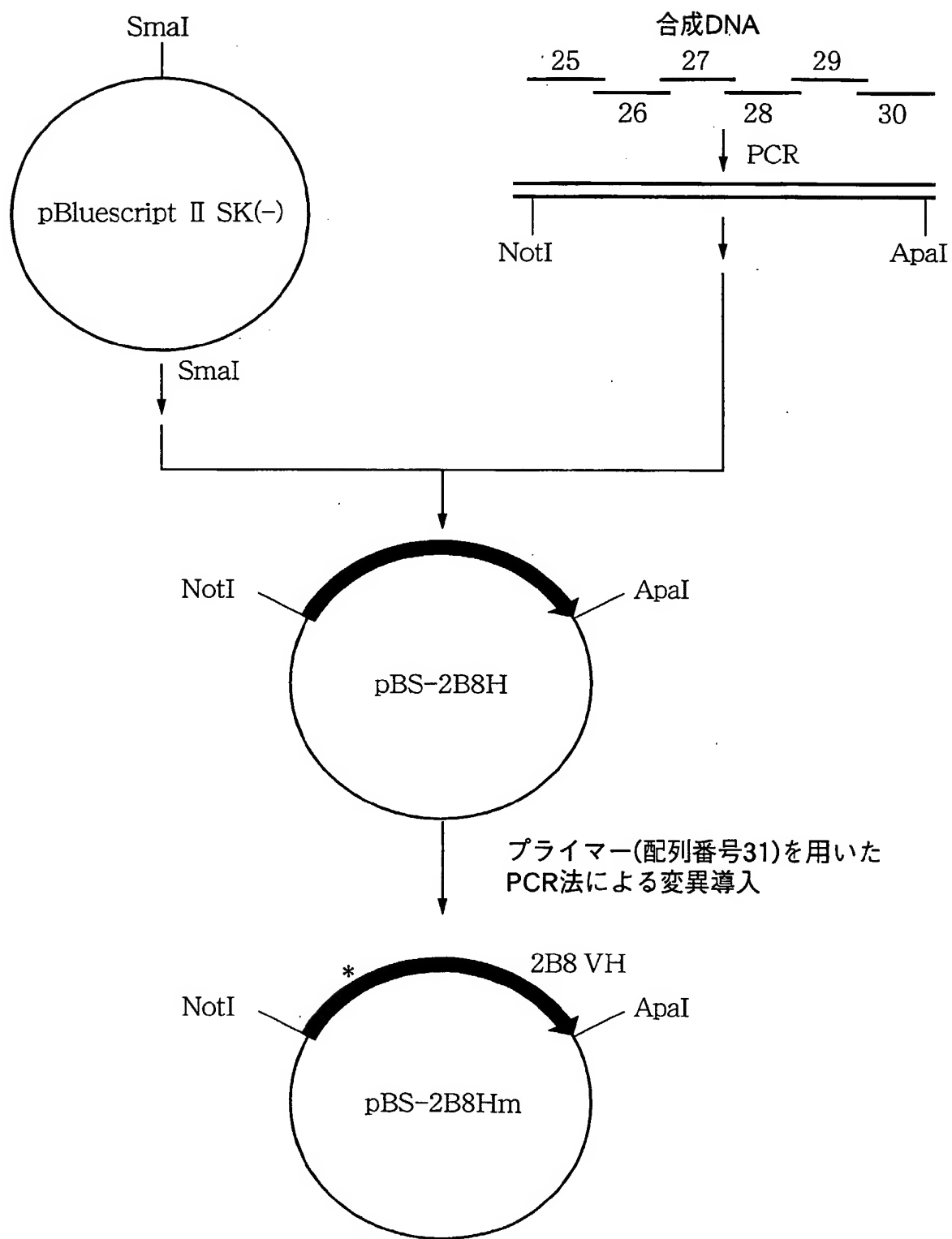
47. 請求項36～43のいずれか1項に記載の抗体組成物を有効成分として含有するCD20関連疾患の治療薬。

48. CD20関連疾患が、癌または免疫疾患である請求項47記載の治療薬。

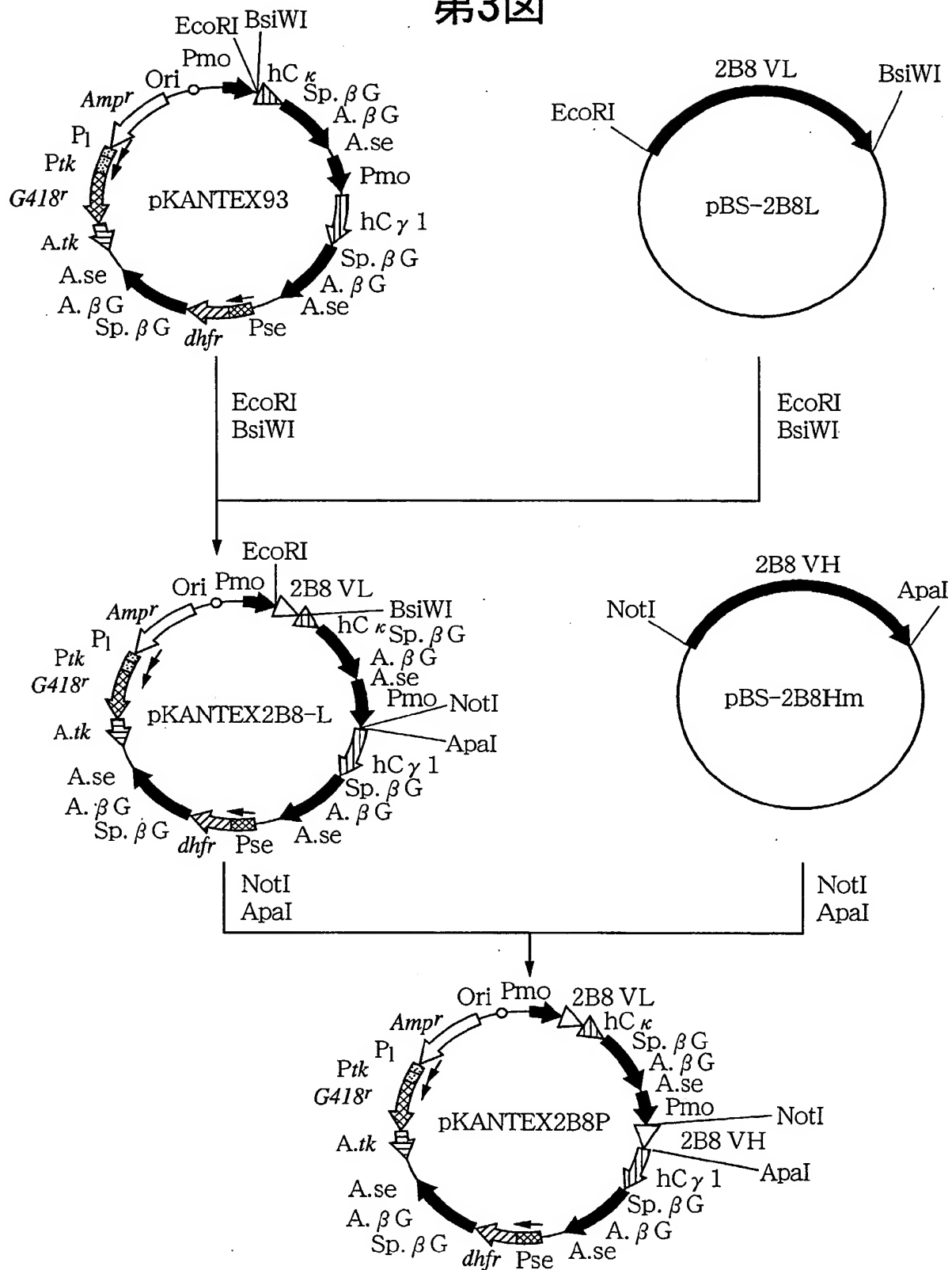
第1図



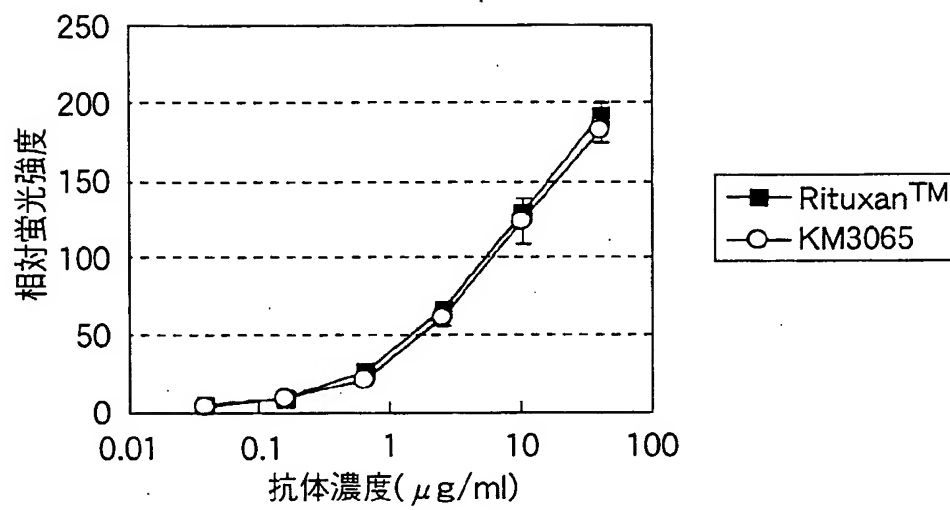
第2図



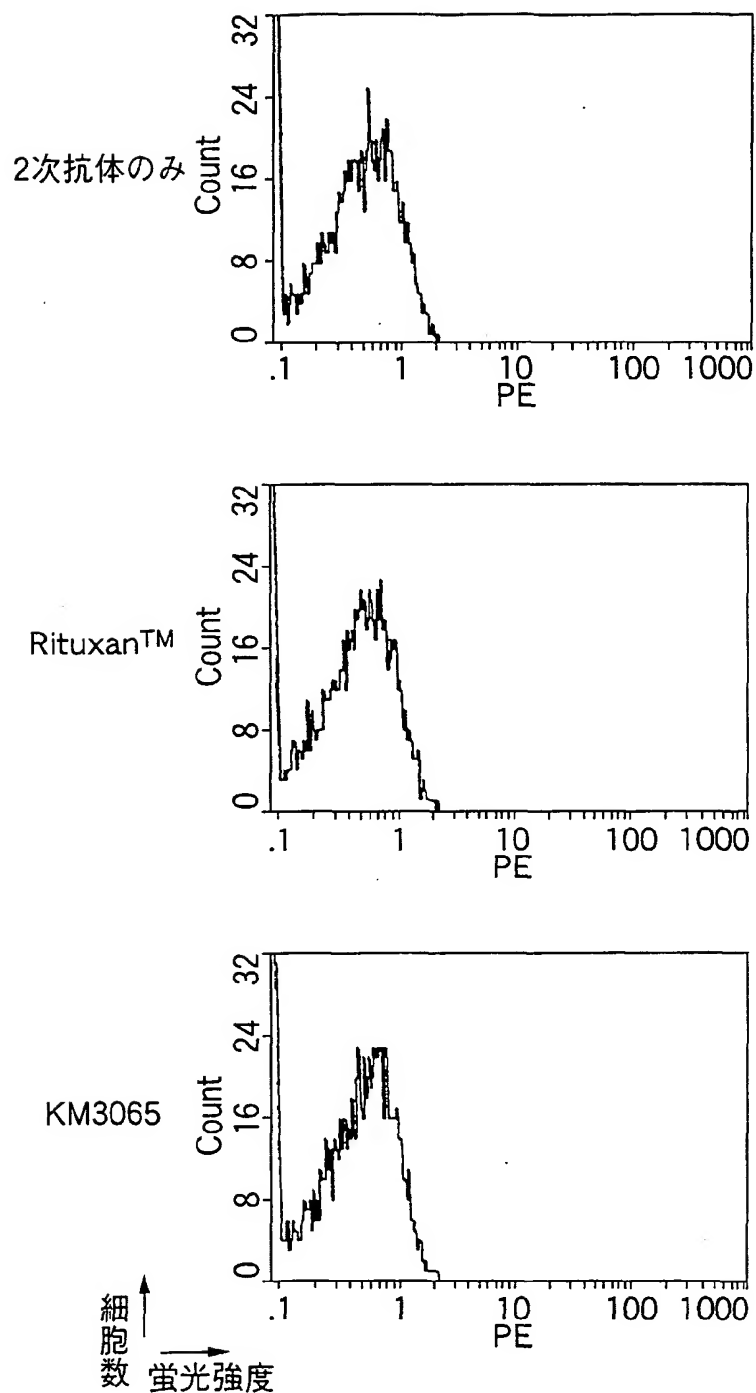
第3図



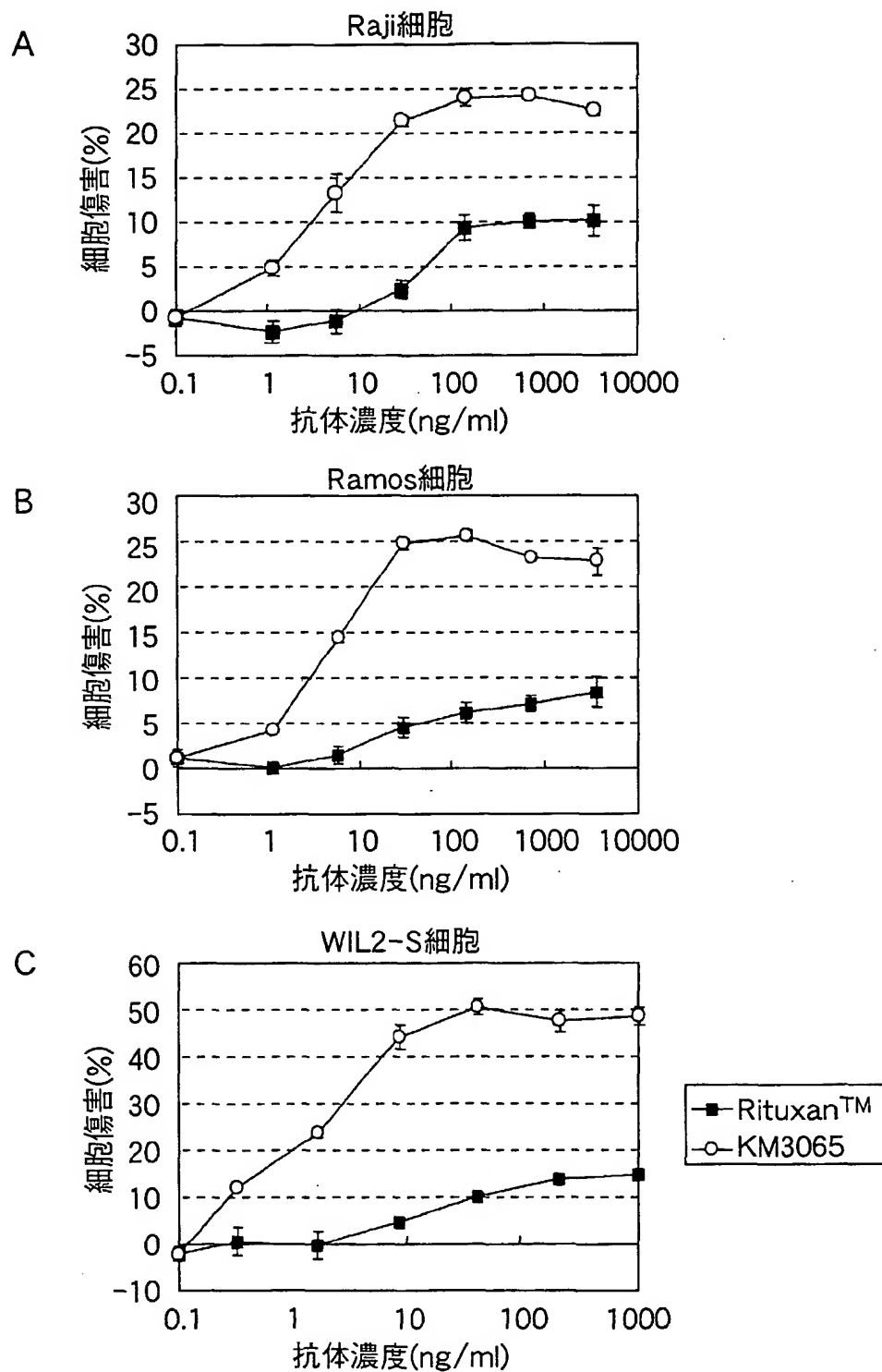
第4図



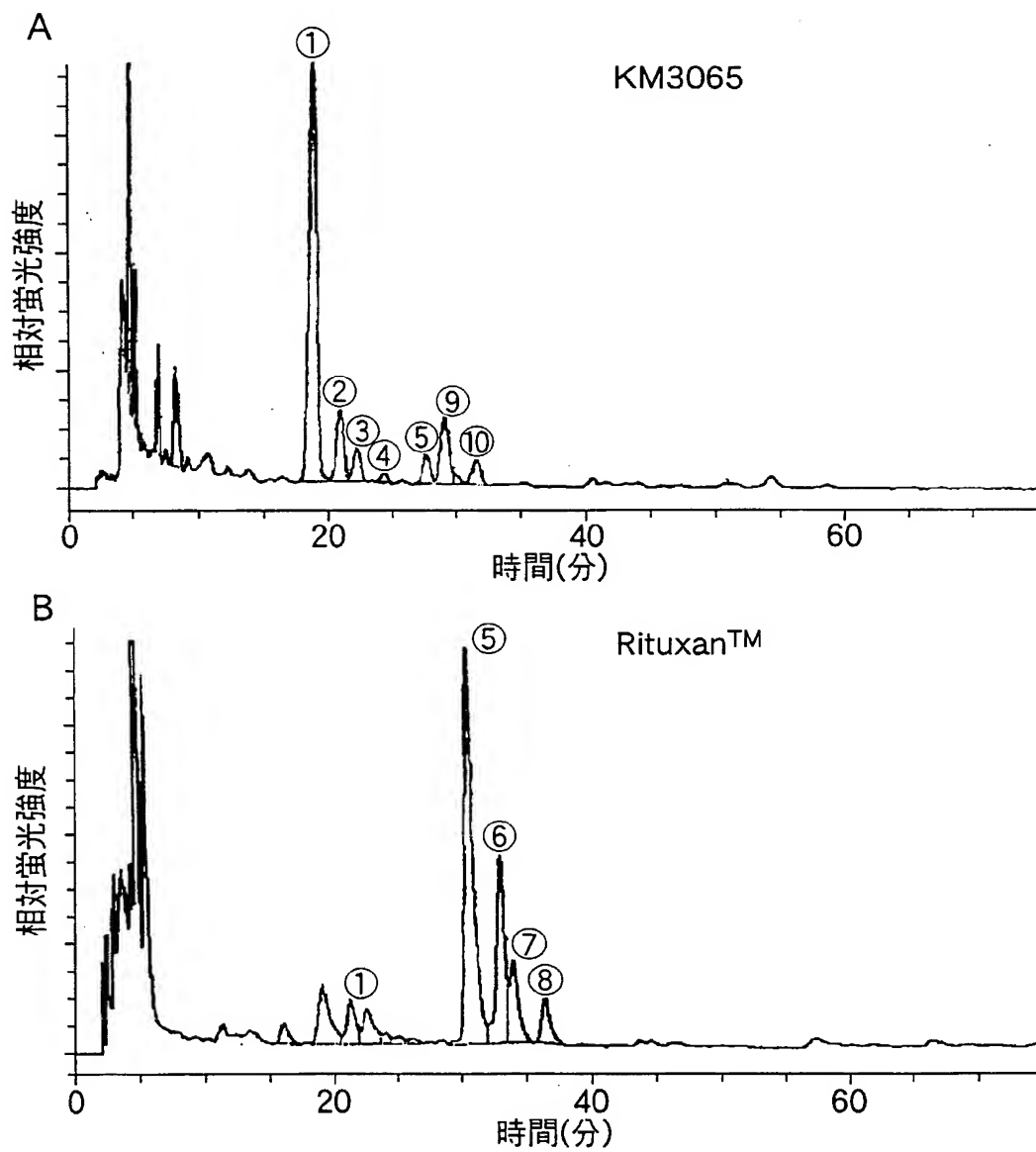
第5図



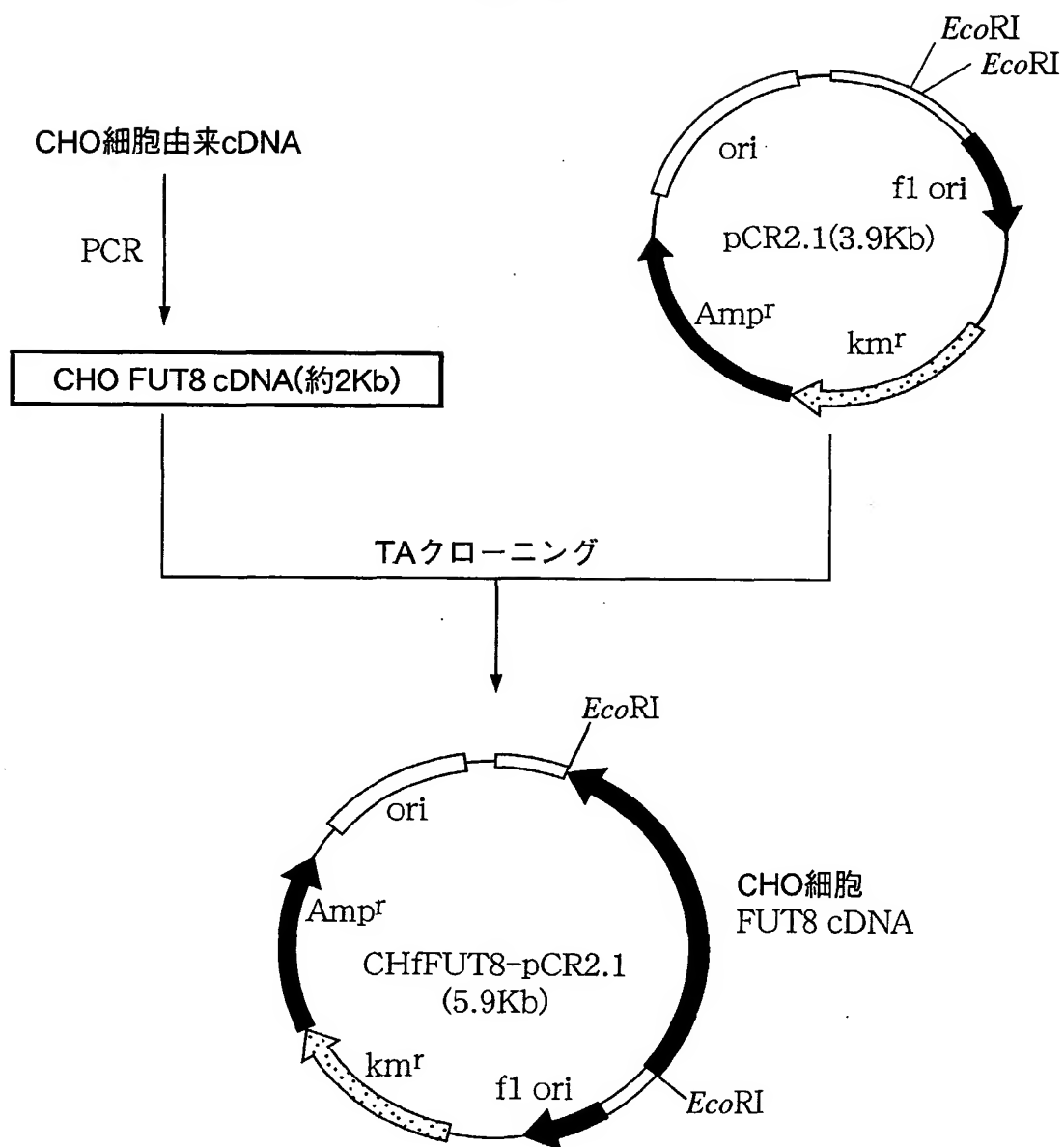
第6図



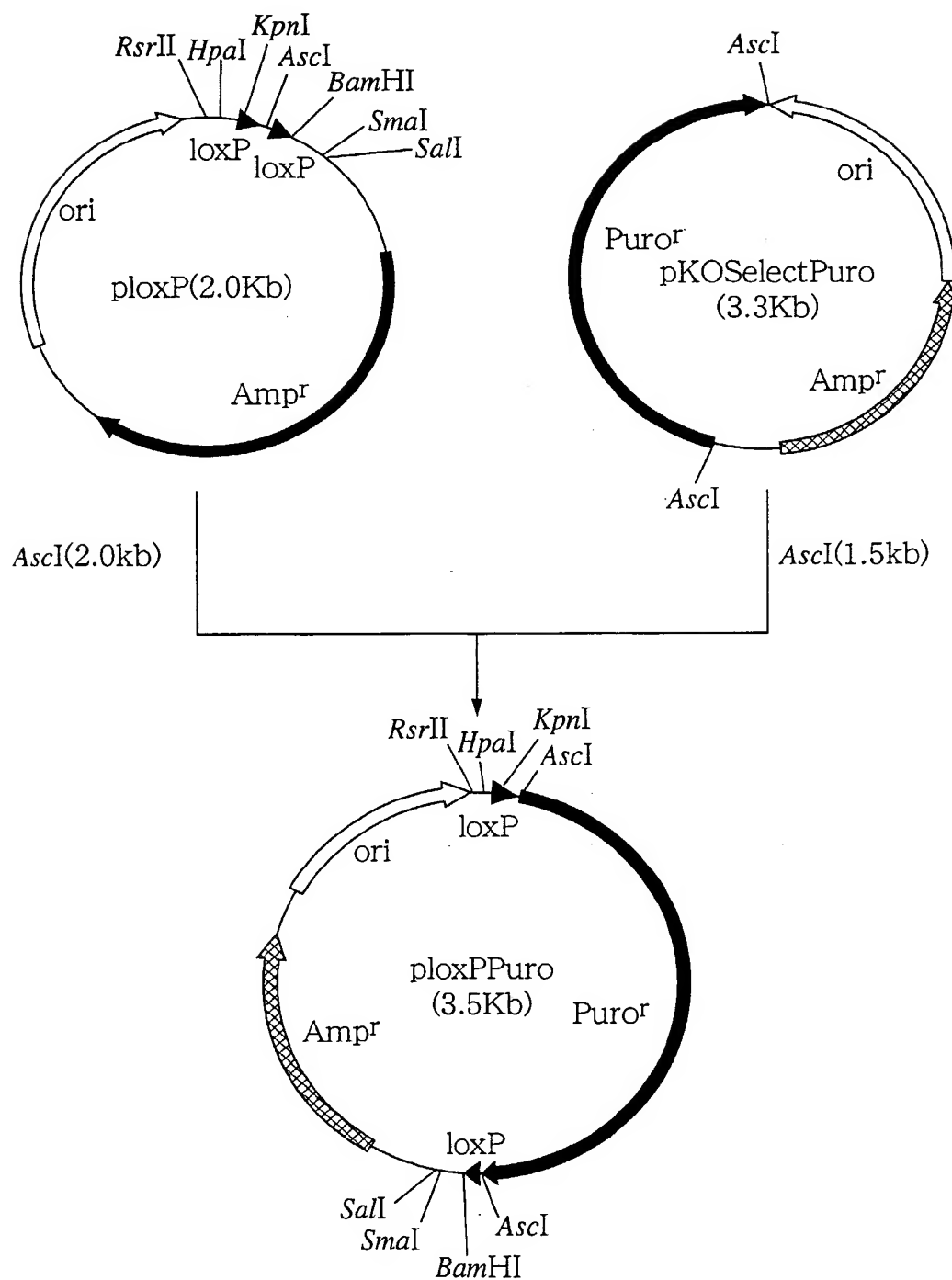
第7図



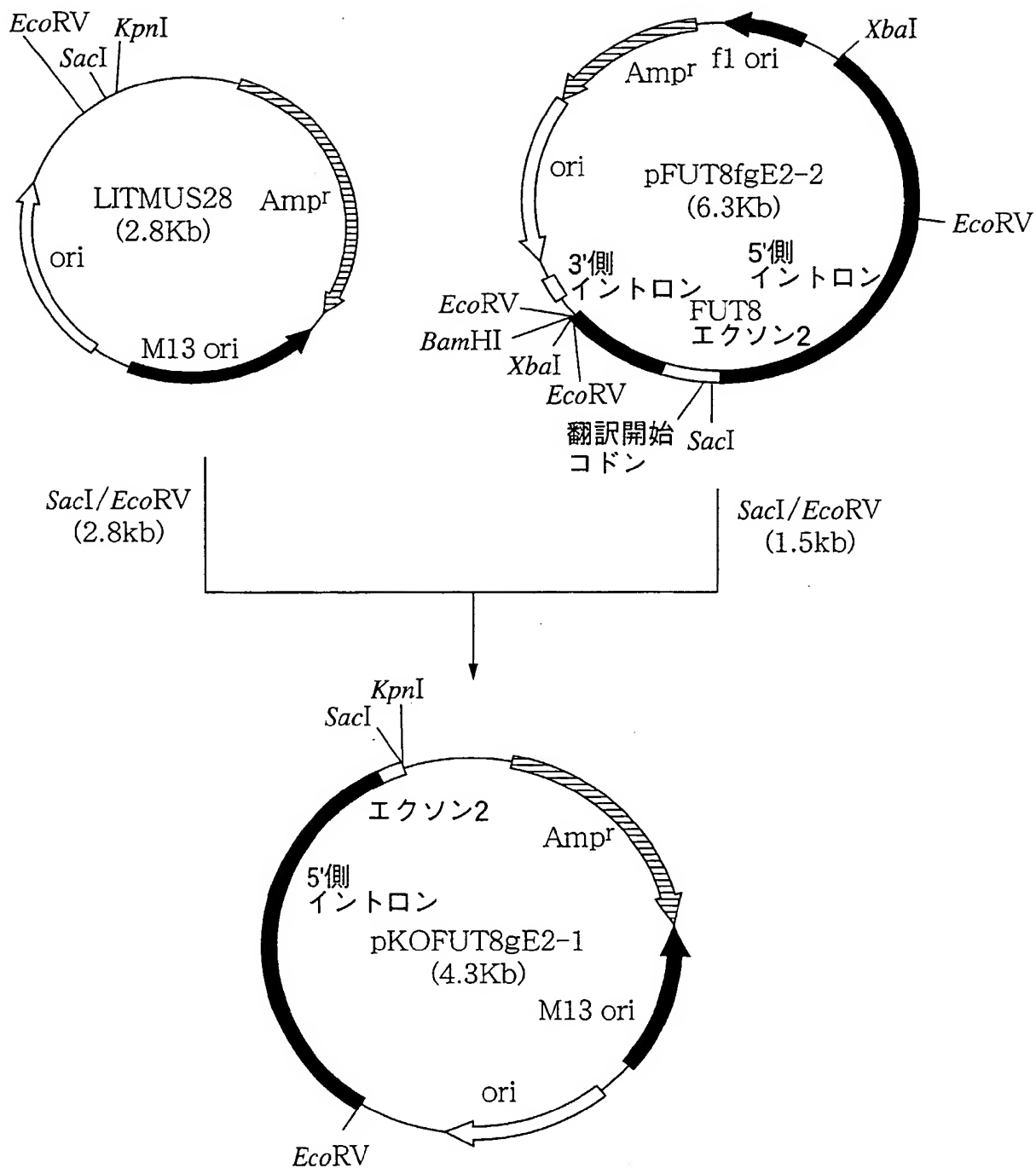
第8図



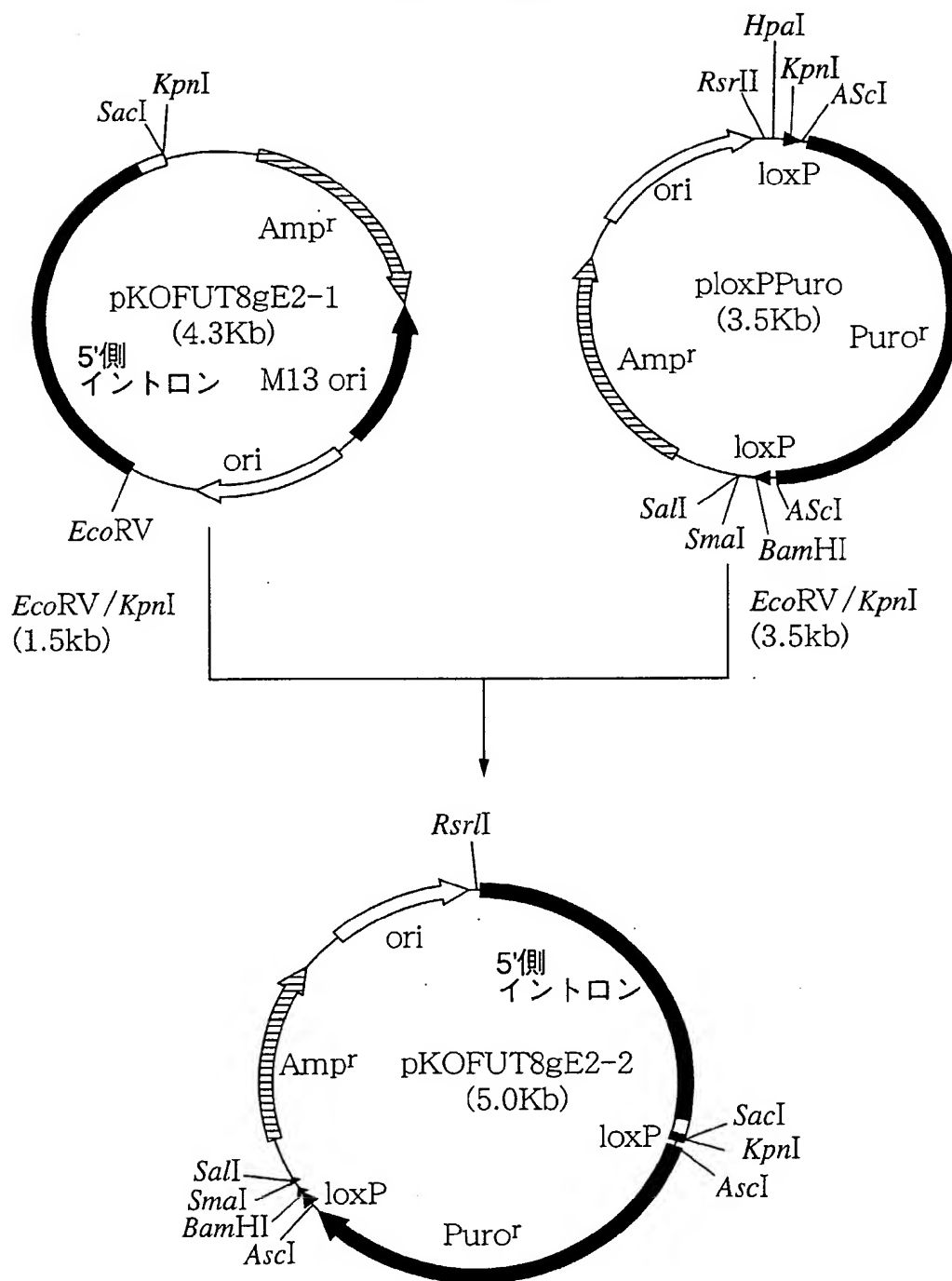
第9図



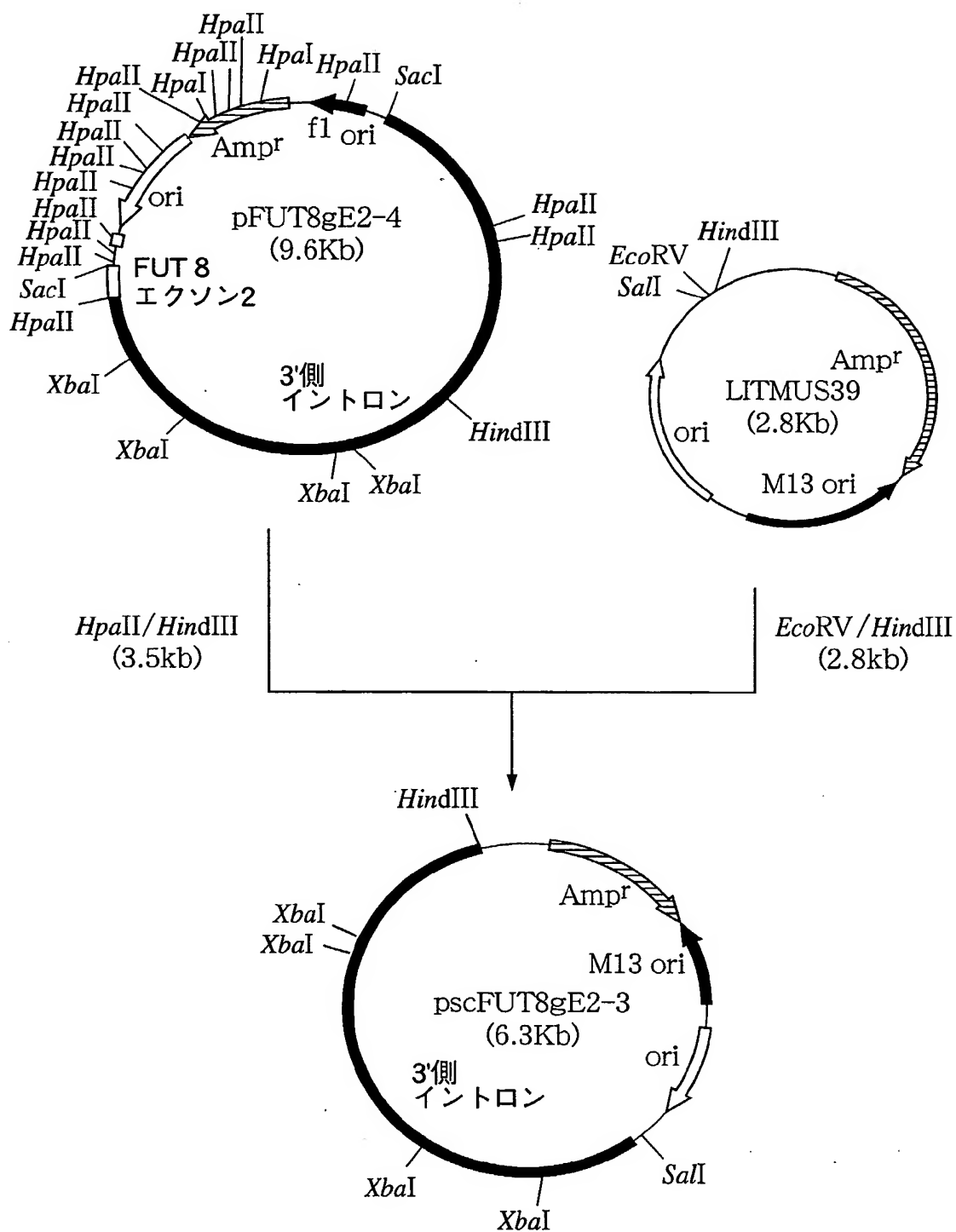
第10図



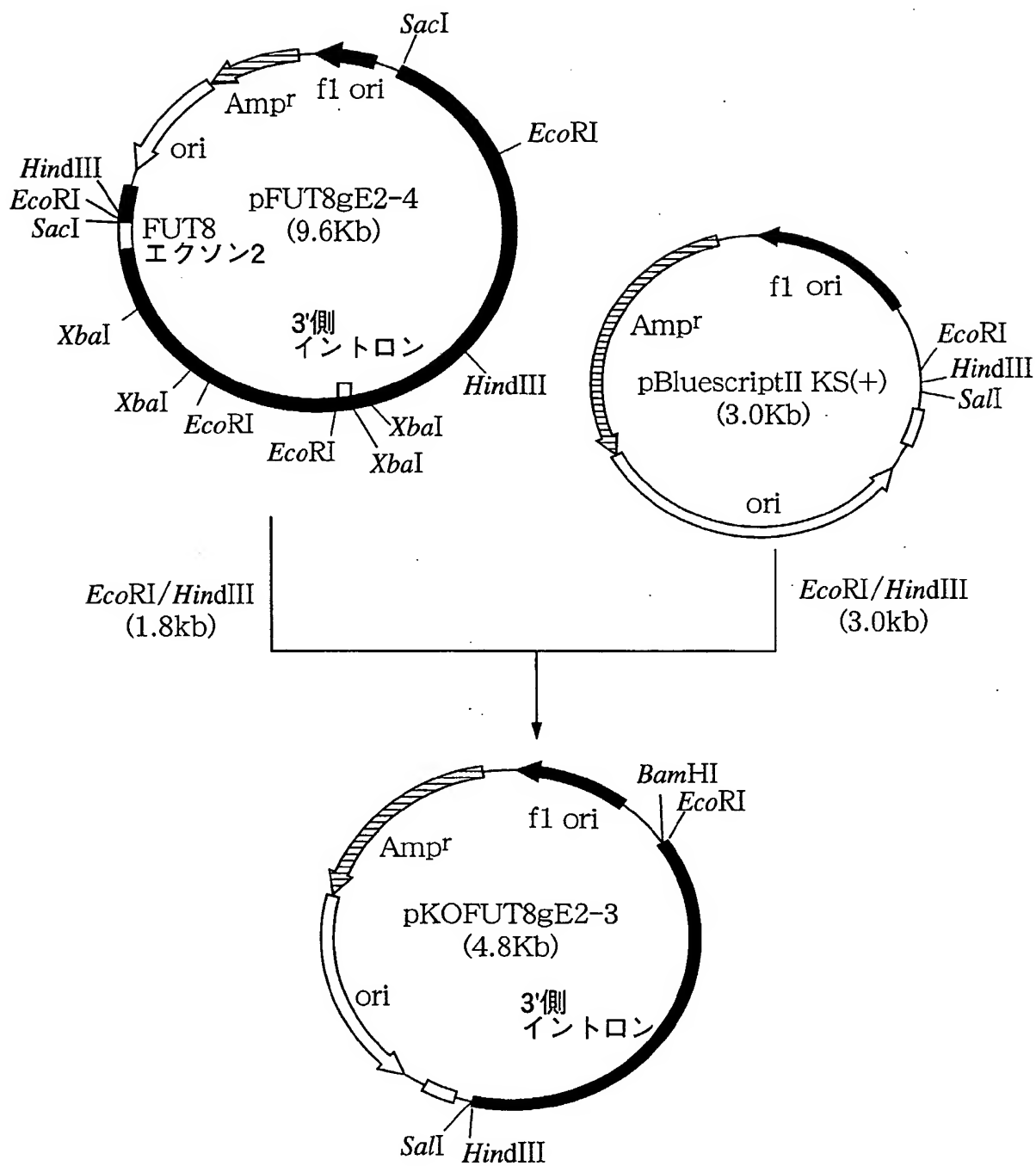
第11図



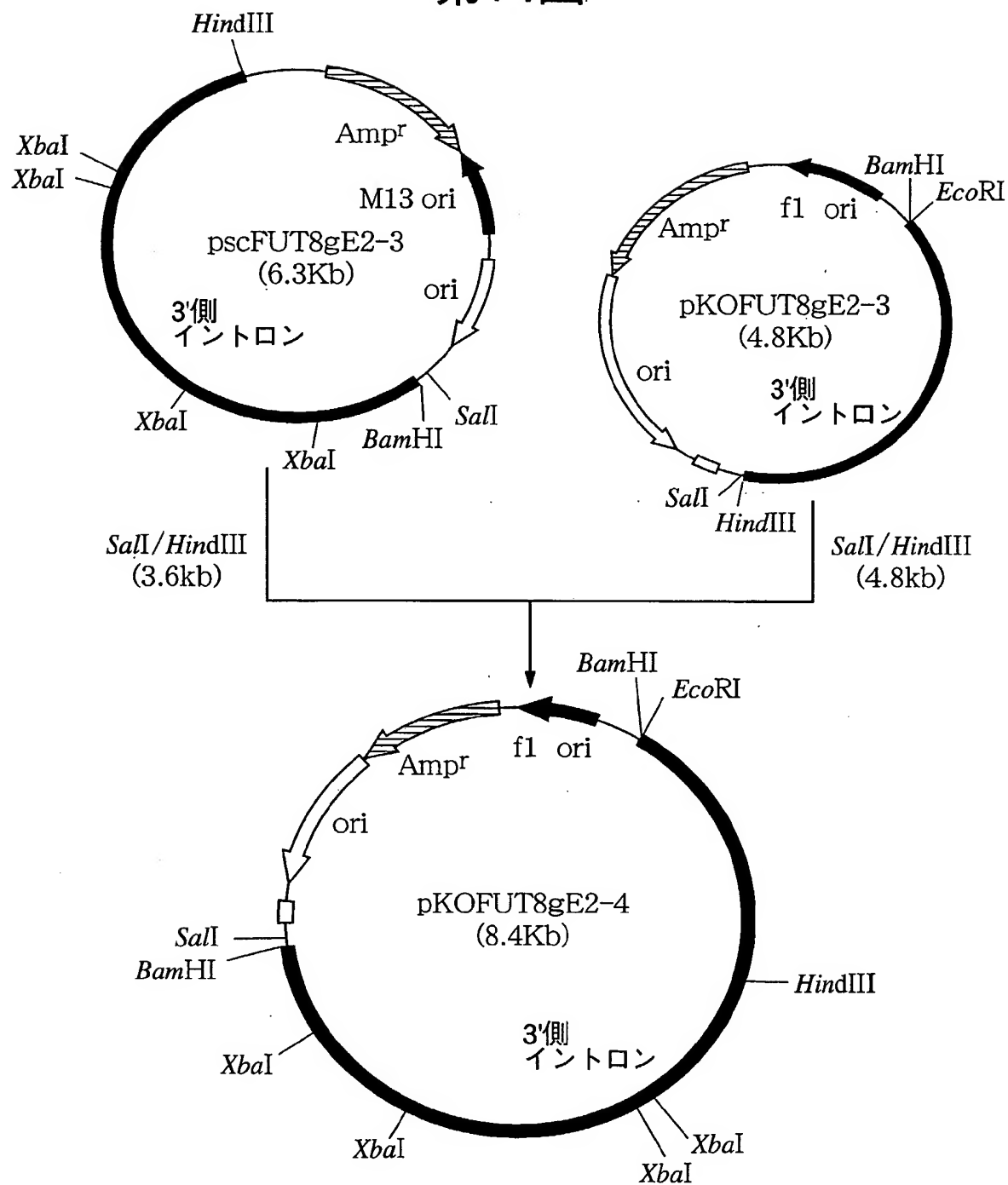
第12図



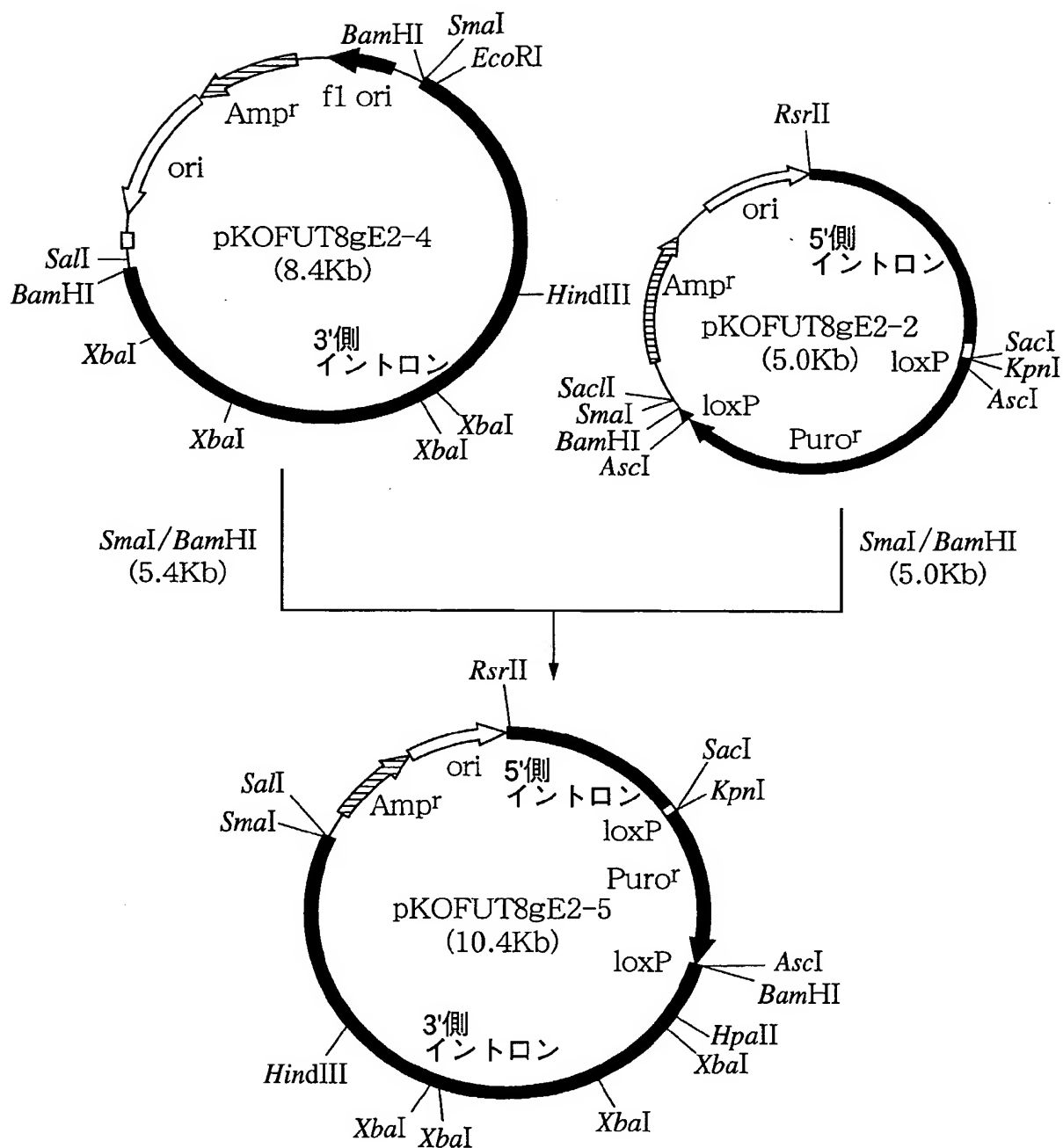
第13図



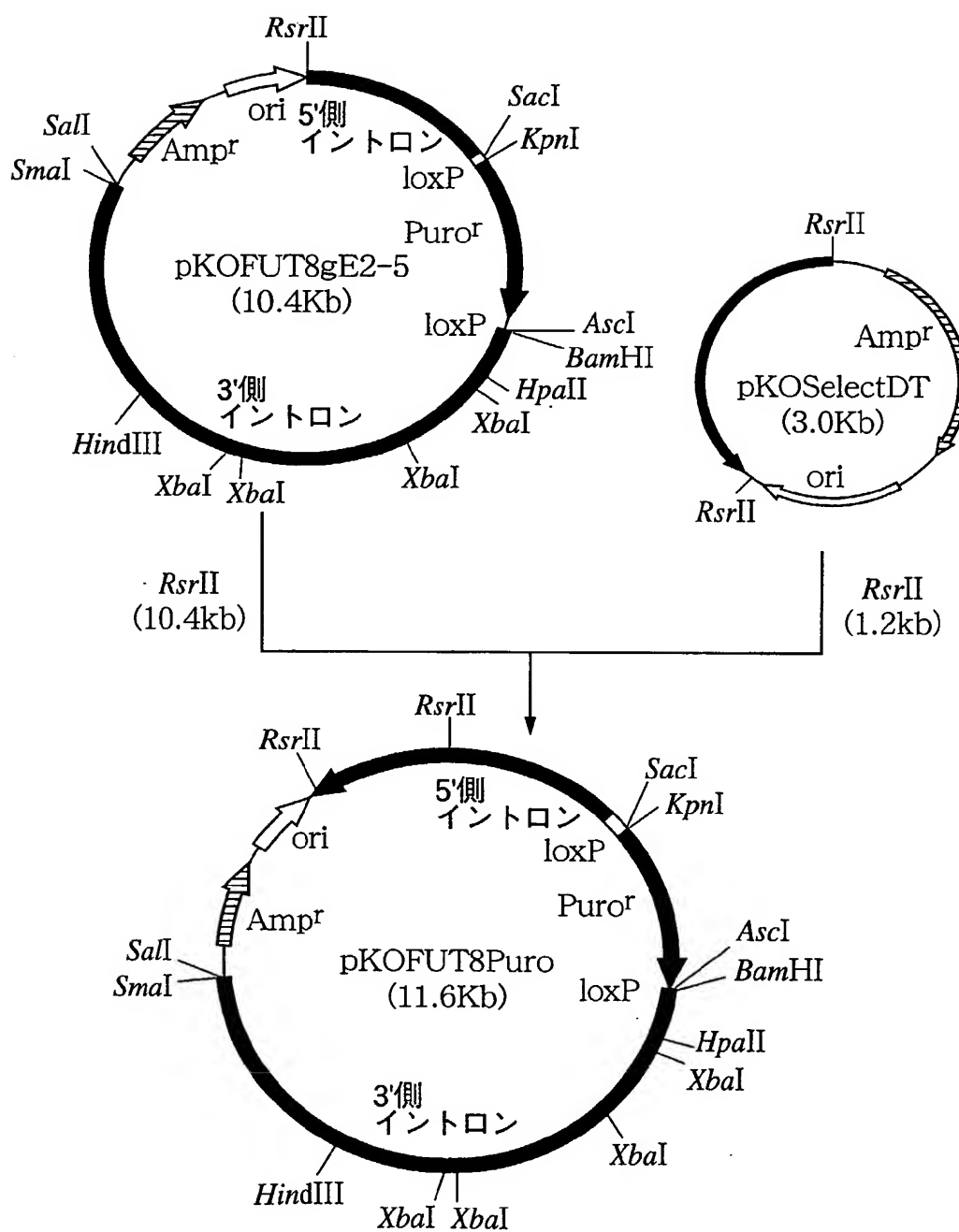
第14図



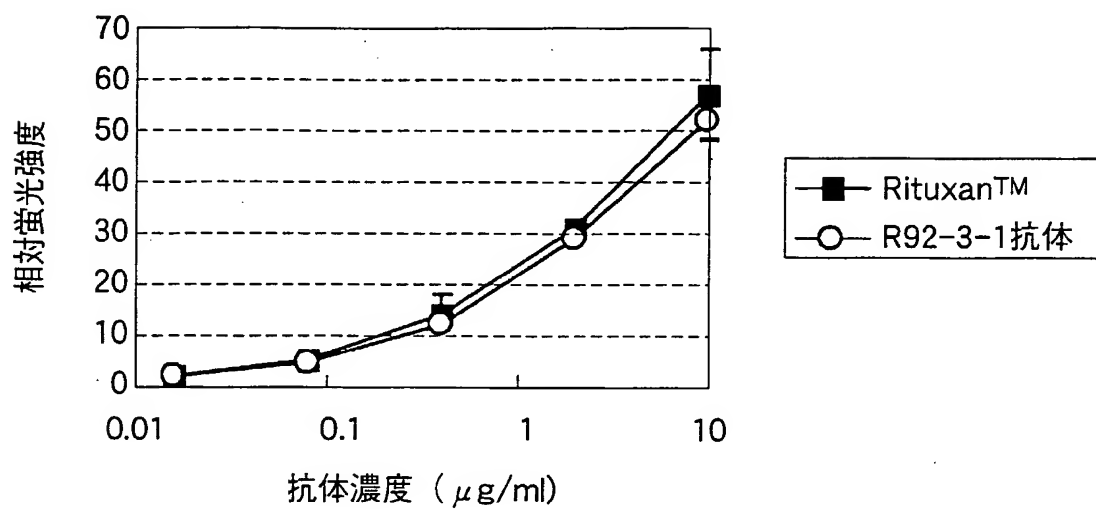
第15図



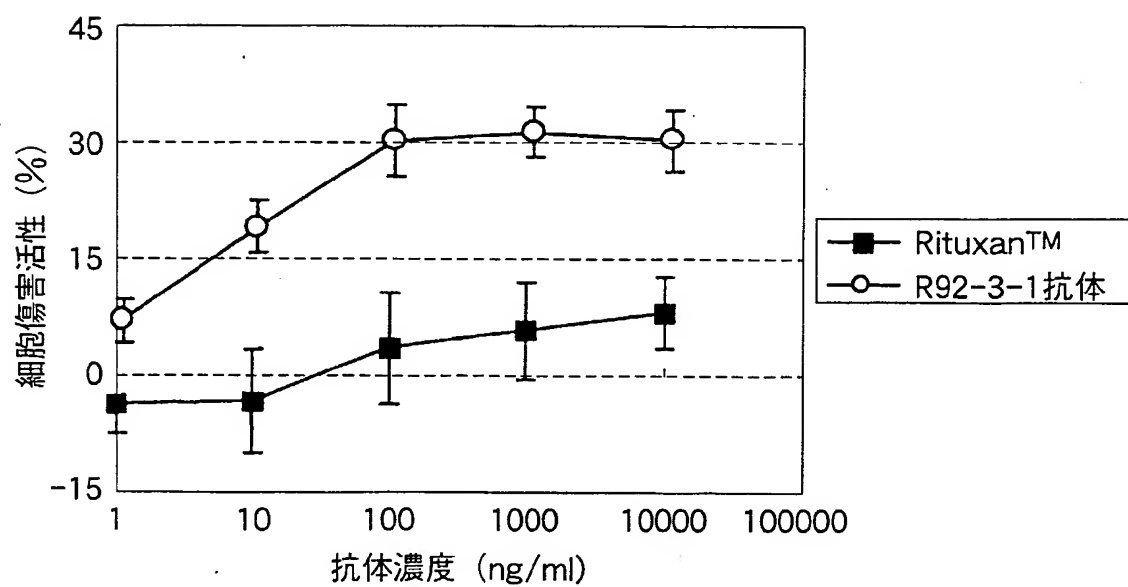
第16図



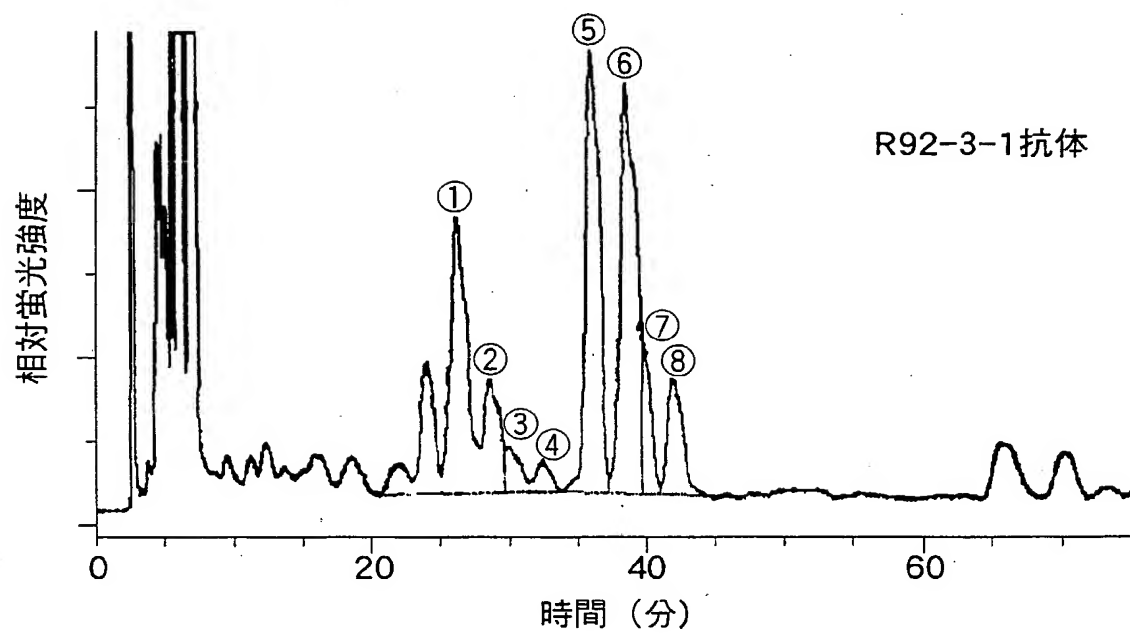
第17図



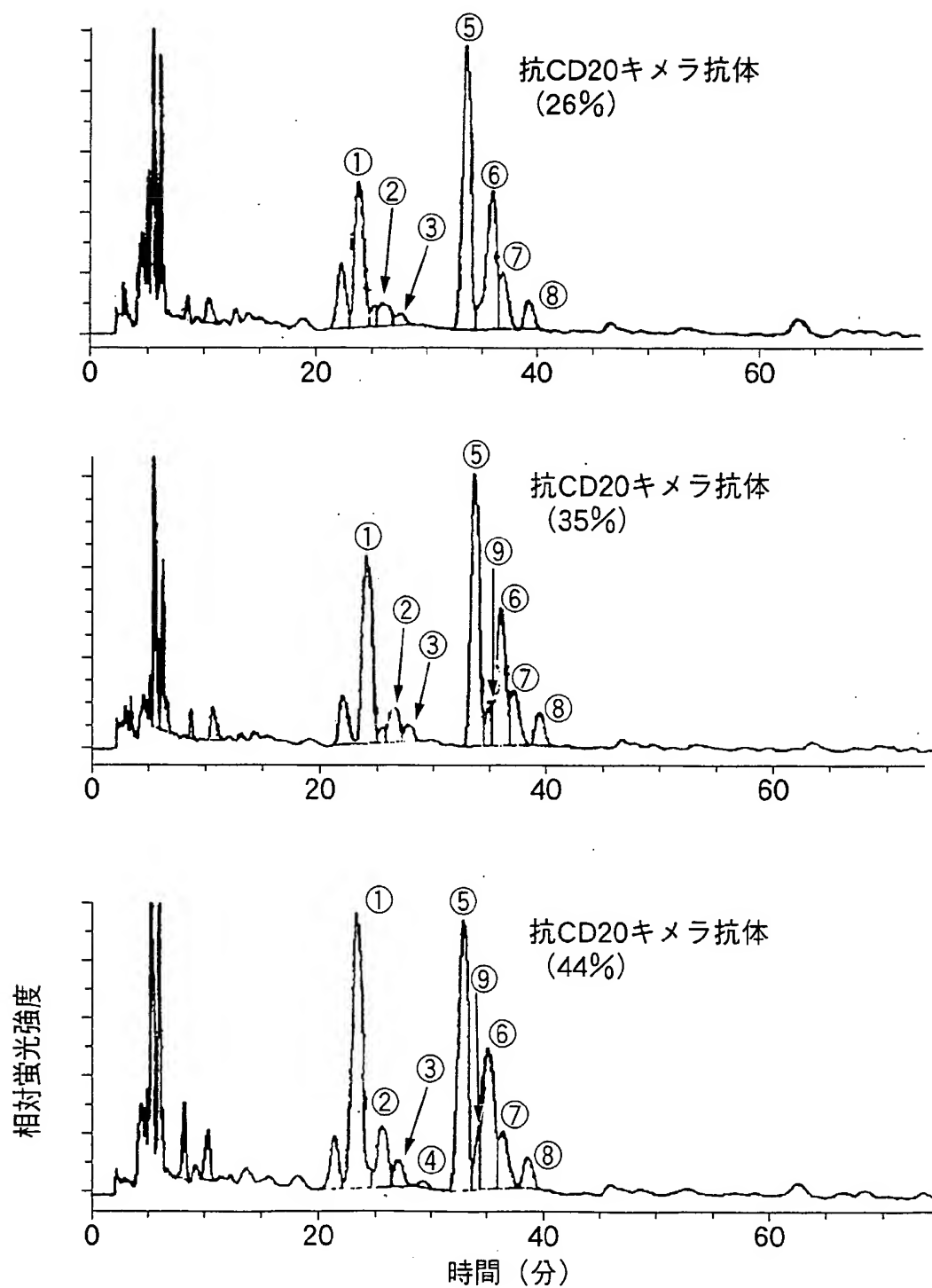
第18図



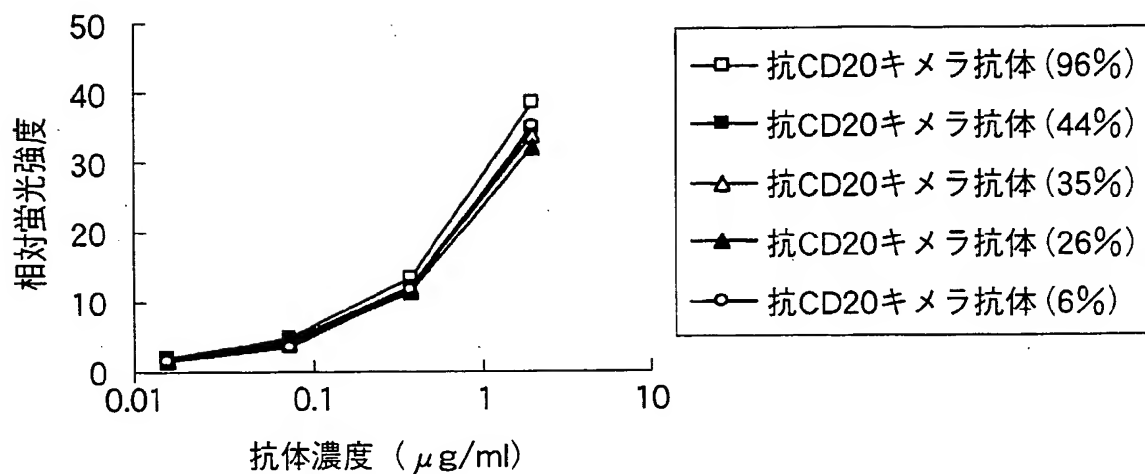
第19図



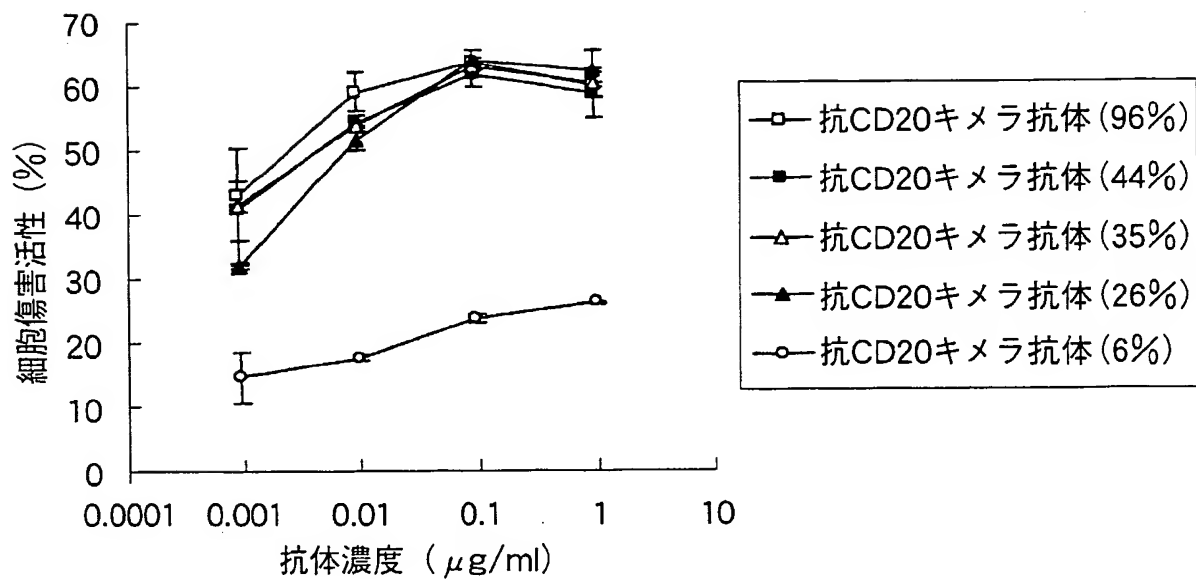
第21図



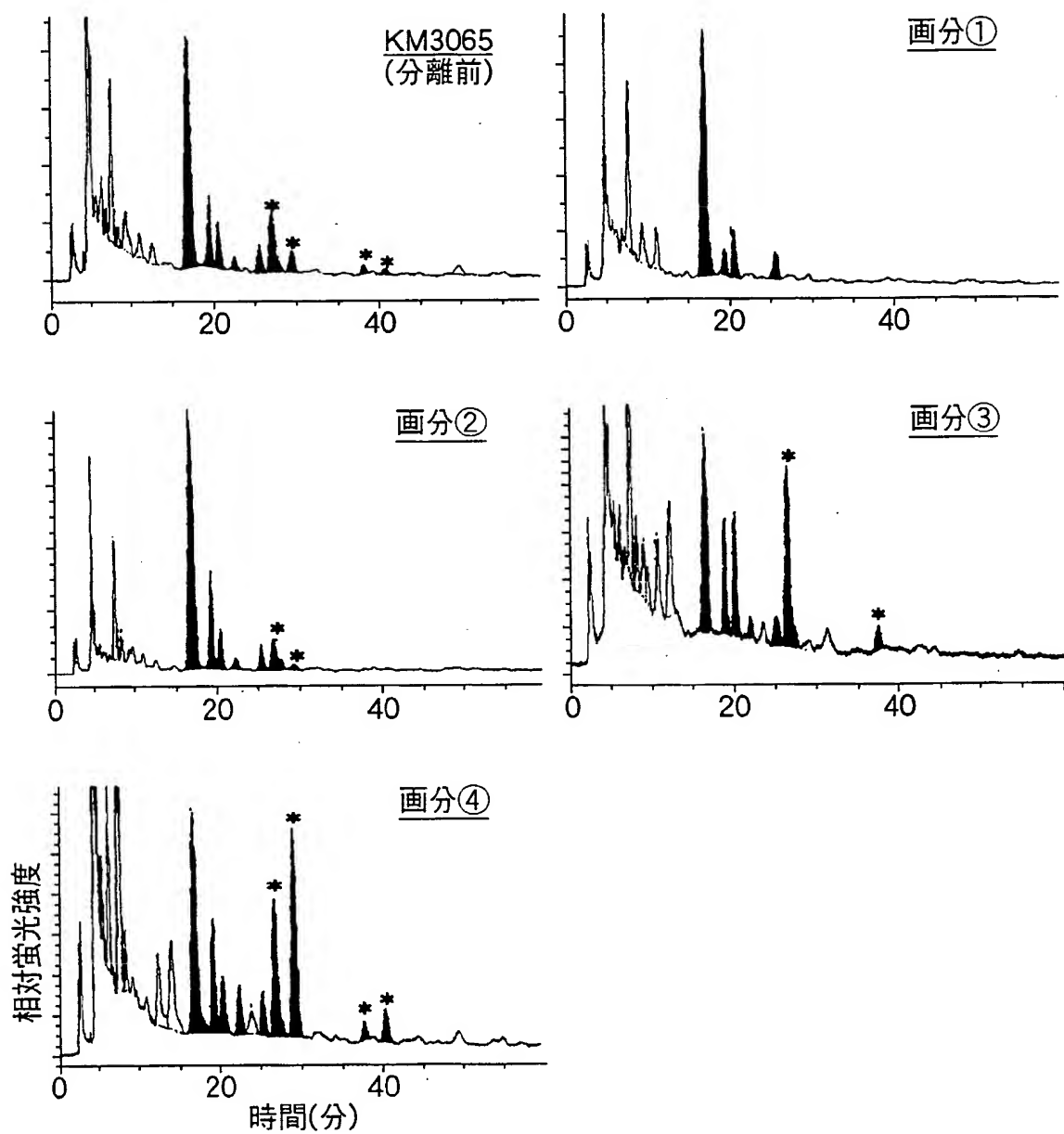
第22図



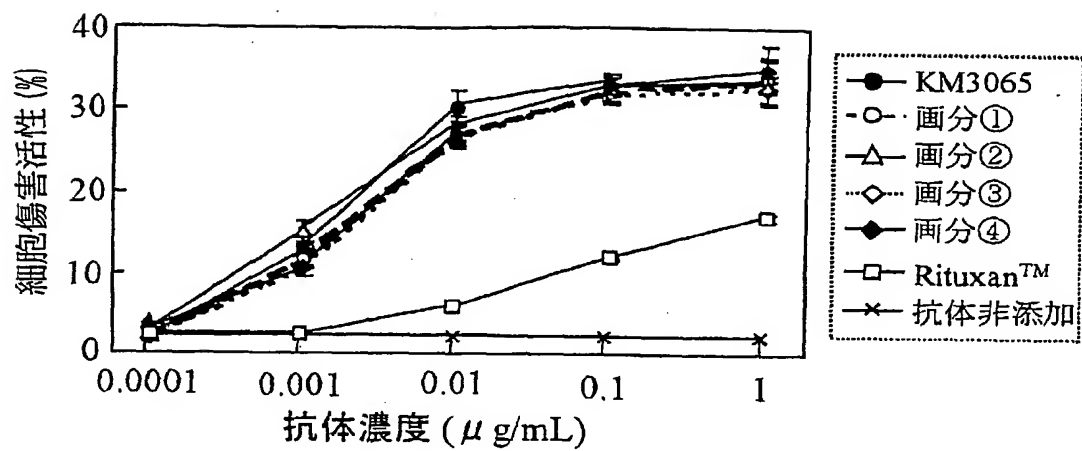
第23図



第26図



第 2 7 図



SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> ANTI-CD20 ANTIBODY COMPOSITION

<130> 11440W01

<140> JP 2001-392753

<141> 2001-12-25

<140> JP 2002-106948

<141> 2001-04-09

<140> JP 2002-319975

<141> 2001-11-01

<160> 63

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2008

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 1

aacagaaact tattttcctg tgtggctaac tagaaccaga gtacaatggt tccaattctt 60

tgagctccga gaagacagaa gggagttgaa actctgaaaa tgcgggcatg gactggttcc 120

tggcgttgga ttatgctcat tctttttgcc tgggggacct tattgtttta tataggtggg 180

catttggttc gagataatga ccacctgac cattctagca gagaactctc caagattctt 240

gcaaagctgg agcgcttaaa acaacaaaat gaagacttga ggagaatggc tgagtctctc 300

cgaataccag aaggccctat tgatcagggg acagctacag gaagagtccg tgtttttagaa 360

gaacagcttg ttaaggccaa agaacagatt gaaaattaca agaaacaagc taggaatgat 420
ctgggaaagg atcatgaaat ctttaaggagg aggattgaaa atggagctaa agagctcttg 480
ttttttctac aaagtgaatt gaagaaatta aagaaattag aaggaaacga actccaaaga 540
catgcagatg aaattctttt ggatttagga catcatgaaa ggtctatcat gacagatcta 600
tactacctca gtcaaacaga tggagcaggt gagtggcggg aaaaagaagc caaagatctg 660
acagagctgg tccagcggag aataacatat ctgcagaatc ccaaggactg cagcaaagcc 720
agaaagctgg tatgtaatat caacaaaggc tgtggctatg gatgtcaact ccatcatgtg 780
gtttactgct tcatgattgc ttatggcacc cagcgaacac tcatcttgga atctcagaat 840
tggcgctatg ctactggagg atgggagact gtgtttagac ctgtaagtga gacatgcaca 900
gacaggtctg gcctctccac tggacactgg tcaggtgaag tgaaggacaa aaatgttcaa 960
gtggtcgagc tccccattgt agacagcctc catcctcgtc ctccttactt acccttggct 1020
gtaccagaag accttgcaga tcgactcctg agagtccatg gtgatcctgc agtgtggtgg 1080
gtatcccagt ttgtcaaata ctgatccgt ccacaacctt ggctggaaag ggaaatagaa 1140
gaaaccacca agaagcttgg cttcaaacat ccagttattg gagtccatgt cagacgcact 1200
gacaaagtgg gaacagaagc agccttccat ccattgagg aatacatggt acacgttgaa 1260
gaacattttc agcttctcga acgcagaatg aaagtggata aaaaaagagt gtatctggcc 1320
actgatgacc cttctttgtt aaaggaggca aagacaaagt actccaatta tgaatttatt 1380
agtgataact ctatttcttg gtcagctgga ctacacaacc gatacacaga aaattcactt 1440

cggggcgtga tccctggatat acactttctc tcccaggctg acttccttgt gtgtactttt 1500
 tcatcccagg tctgtagggg tgcttatgaa atcatgcaaa cactgcatcc tgatgcctct 1560
 gcaaacttcc attctttaga tgacatctac tatttttgag gccaaaatgc ccacaaccag 1620
 attgcagttt atcctcacca acctcgaact aaagaggaaa tccccatgga acctggagat 1680
 atcattgggtg tggctggaaa ccattggaat ggttactcta aaggtgtcaa cagaaaacta 1740
 ggaaaaacag gcctgtaccc ttctacaaa gtccgagaga agatagaaac agtcaaatac 1800
 cctacatata ctgaagctga aaaatagaga tggagtgtaa gagattaaca acagaattta 1860
 gttcagacca tctcagccaa gcagaagacc cagactaaca tatggttcat tgacagacat 1920
 gctccgcacc aagagcaagt gggaaccctc agatgctgca ctggtggaac gcctctttgt 1980
 gaagggtgc tgtgcctca agcccatg 2008

<210> 2

<211> 1728

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

atgcgggcat ggactggttc ctggcgttgg attatgctca ttctttttgc ctgggggacc 60
 ttgttatattt atataggtgg tcatttggtt cgagataatg accaccctga tcaactccagc 120
 agagaactct ccaagattct tgcaaagctt gaacgcttaa aacagcaaaa tgaagacttg 180
 aggcgaatgg ctgagtctct ccgaatacca gaaggcccca ttgaccaggg gacagctaca 240
 ggaagagtcc gtgtttttaga agaacagctt gttaaggcca aagaacagat tgaaaattac 300

aagaaacaag ctagaaatgg tctggggaag gatcatgaaa tcttaagaag gaggattgaa 360
aatggagcta aagagctctg gttttttcta caaagcgaac tgaagaaatt aaagcattta 420
gaaggaaatg aactccaaag acatgcagat gaaattcttt tggatttagg acaccatgaa 480
aggtctatca tgacagatct atactacctc agtcaaacag atggagcagg ggattggcgt 540
gaaaaagagg ccaaagatct gacagagctg gtccagcgga gaataacata tctccagaat 600
cctaaggact gcagcaaagc caggaagctg gtgtgtaaca tcaataaagg ctgtggctat 660
ggttgtcaac tccatcacgt ggtctactgt ttcattgattg cttatggcac ccagcgaaca 720
ctcatcttgg aatctcagaa ttggcgctat gctactgggtg gatgggagac tgtgtttaga 780
cctgtaagtg agacatgtac agacagatct ggctctcca ctggacactg gtcaggtgaa 840
gtaaatagaca aaaacattca agtggtcgag ctccccattg tagacagcct ccattctcgg 900
cctcettact taccactggc tgttccagaa gaccttgag accgactcct aagagtccat 960
ggtgaccctg cagtgtgggtg ggtgtcccag tttgtcaaata acttgattcg tccacaacct 1020
tggctggaaa aggaaataga agaagccacc aagaagcttg gttcaaaca tccagttatt 1080
ggagtccatg tcagacgcac agacaaagtg ggaacagaag cagccttcca cccatcgag 1140
gagtacatgg tacacgttga agaacatttt cagcttctcg cagcagaat gcaagtggat 1200
aaaaaaagag tatatctggc tactgatgat cctactttgt taaaggaggc aaagacaaag 1260
tactccaatt atgaatttat tagtgataac tctatttctt ggtcagctgg actacacaat 1320
cggtacacag aaaattcact tcgggggtgtg atcctggata tacactttct ctcacaggct 1380

gactttctag tgtgtacttt ttcattcccag gtctgtcggg ttgcttatga aatcatgcaa 1440
 accctgcctc ctgatgcctc tgcgaacttc cattctttgg atgacatcta ctattttgga 1500
 ggccaaaatg cccacaatca gattgctggt taccctcaca aacctcgaaac tgaagaggaa 1560
 attccaatgg aacctggaga tatcattggt gtggcctggaa accattggga tggttattct 1620
 aaaggtatca acagaaaact tggaaaaaca ggcttatatc cctcctacaa agtccgagag 1680
 aagatagaaa cagtcaagta tcccacatat cctgaagctg aaaaatag 1728
 <210> 3
 <211> 9196
 <212> DNA
 <213> Cricetulus griseus

<400> 3
 tctagaccag gctggtctcg aactcacaga gaaccacctg cctctgccac ctgagtgtg 60
 ggattaaagg tgtgcaccac caccgcccgg cgtaaaatca tatttttgaa tattgtgata 120
 atttacatta taattgtaag taaaaatttt cagcctatct tgttatacat ttttgcgtaa 180
 attattcttt tttgaaagtt ttgtgtcca taatagtcta gggaaacata aagttataat 240
 tttgtctat gtatttgcct atatctctat ttaatctcct aatgtccagg aaataaatag 300
 ggatgtaat agcttcaaca tgtggatga tagaattttt cagtgtata taagttgtta 360
 cagcaaagtg ttattaattc atatgtccat atttcaattt tttatgaatt attaaattga 420
 atccttaagc tgccagaact agaattttat tttaatcagg aagccccaaa tctgttcatt 480
 cttctatat atgtggaaag gtaggcctca ctaactgatt cttcacctgt tttagaacat 540

ggtccaagaa tggagttatg taaggggaat tacaagtgtg agaaaactcc tagaaaacaa 600
gatgagtctt gtgaccttag tttctttaaa aacacaaaat tcttggaatg tgttttcatg 660
ttcctcccag gtggatagga gtgagtttat ttcagattat ttattacaac tggctgttgt 720
tacttgtttc tatgtcttta tagaaaaaca tatttttttt gccacatgca gcttgctcctt 780
atgattttat acttgtgtga ctcttaactc tcagagtata aattgtctga tgctatgaat 840
aaagttggct attgtatgag acttcagccc acttcaatta ttggcttcat tctctcagat 900
cccaccacct ccagagtggg aaacaacttg aaccattaaa cagactttag tctttatttg 960
aatgatagat ggggatatca gatttatagg cacagggttt tgagaaaggg agaaggtaaa 1020
cagtagagtt taacaacaac aaaaagtata ctttgtaaac gtaaaactat ttattaaagt 1080
agtagacaag acattaaata ttccttgga ttagtgcttt ttgaattttg ctttcaaata 1140
atagtcagtg agtatacccc tccccattc tatatttttag cagaaatcag aataaatggg 1200
gtttctggta cattcttttg tagagaattt attttcttg ggtttttgtg catttaaagt 1260
caataaaaat taaggttcag taatagaaaa aaaactctga tttttggaat cccctttctt 1320
cagcttttct atttaatctc ttaatgataa tttaatttgt ggccatgtgg tcaaagtata 1380
tagccttgta tatgtaaatg ttttaaccaa cctgccttta cagtaactat ataattttat 1440
tctataatat atgacttttc ttccatagct ttagagttgc ccagtcactt taagttacat 1500
tttcataat gttctttgtg ggaggagata attttatttc taagagaatc ctaagcatac 1560
tgattgagaa atggcaaaca aaacacataa ttaaagctga taaagaacga acatttggag 1620

tttaaaatac atagccaccc taagggttta actgttgtaa gccttctttt ggaattttta 1680
ttagttcata tagaaaaatg gattttatcg tgacatttcc atatatgtat ataatatatt 1740
tacatcatat ccacctgtaa ttattagtgt ttttaaatat atttgaaaaa ataatggtct 1800
ggtttgatcc atttgaacct tttgatgttt ggtgtggttg ccaattgggt gatggttatg 1860
ataacctttg cttctctaag gttcaagtca gtttgagaat atgtcctcta aaaatgacag 1920
gttgcaagtt aagtagtgag atgacagcga gatggagtga tgagaatttg tagaaatgaa 1980
ttcacttata ctgagaactt gttttgcttt tagataatga acatattagc ctgaagtaca 2040
tagccgaatt gattaattat tcaaagatat aatcttttaa tccctataaa agaggtatta 2100
cacaacaatt caagaaagat agaattagac ttccagtatt ggagtgaacc atttgttatc 2160
aggtagaacc ctaacgtgtg tggttgactt aaagtgttta ctttttacct gatactgggt 2220
agctaattgt ctttcagcct cctggccaaa gataccatga aagtcaactt acgttgtatt 2280
ctatatctca aacaactcag ggtgtttctt actctttcca cagcatgtag agcccaggaa 2340
gcacaggaca agaaagctgc ctcttgatat caccaggaag atctttttgt aagagtcac 2400
acagtatacc agagagacta atttgtctg aagcatcatg tgttgaaaca acagaaactt 2460
attttcctgt gtggctaact agaaccagag tacaatgttt ccaattcttt gagctccgag 2520
aagacagaag ggagttgaaa ctctgaaaat gcgggcatgg actggttccct ggcgttgat 2580
tatgctcatt ctttttgctt gggggacctt attgttttat ataggtggtc atttggttcg 2640
agataatgac caccctgacc attctagcag agaactctcc aagattcttg caaagctgga 2700

gcgcttaaaa caacaaaatg aagacttgag gagaatggct gagtctctcc ggtaggtttg 2760
aaatactcaa ggatttgatg aaatactgtg ctigaccttt aggtataggg tctcagtctg 2820
ctgttgaaaa atataatttc tacaaccgt ctttgtaaaa ttttaagtat tgtagcagac 2880
tttttaaaag tcagtgatac atctatatag tcaatatagg ttacatagt tgcaatctta 2940
ttttgcataat gaatcagtat atagaagcag tggcatttat atgcttatgt tgcatttaca 3000
attatgttta gacgaacaca aactttatgt gatttggatt agtgctcatt aaatTTTTTT 3060
attctatgga ctacaacaga gacataaatt ttgaaaggct tagttactct taaattctta 3120
tgatgaaaag caaaaattca ttgttaaata gaacagtga tccggaatgt gggtaattat 3180
tgccatattt ctagtctact aaaaatttg gcataactgt tcaaaglcac cagllgtttg 3240
gaaagccaaa gtctgattta aatggaaaac ataaacaatg atatctattt ctagatacct 3300
ttaacttgca gttactgagt ttacaagttg tctgacaact ttggattctc ttacttcata 3360
tctaagaatg atcatgtga cagtgttac tgcacttta aaaaactgca gggctagaca 3420
tgcagatatg aagactttga cattagatgt ggtaattggc actaccagca agtgggtatta 3480
agatacagct gaatatatta ctttttgagg aacataattc atgaatggaa agtggagcat 3540
tagagaggat gccttctggc tctccacac cactgtttgc atccattgca tttcacactg 3600
cttttagaac tcagatgttt catatggat attgtgtaac tcaccatcag ttttatcttt 3660
aaatgtctat ggatgataat gtgtgatgtt aacactttta caaaaacaaa tgaagccata 3720
tcctcggtgt gagtttgat ggtggtaatt gtcacaatag gattattcag caaggaacta 3780

agtcagggac aagaagtggg cgatactttg ttggattaaa tcattttact ggaagttcat 3840
cagggagggt tatgaaagtt gtggtctttg aactgaaatt atatgtgatt cattattctt 3900
gatttaggcc ttgctaatag taactatcat ttattgggaa tttgtcatat gtgccaattt 3960
gtcatgggcc agacagcgtg ttttactgaa tttctagata tctttatgag attctagtac 4020
tgttttcage cattttacag atgaagaatc ttaaaaaatg ttaaataatt tagtttgccc 4080
aagattatac gttaacaaat ggtagaacct tctttgaatt ctggcagtat ggctacacag 4140
tccgaactct tatcttcccta agctgaaaac agaaaaagca atgaccaga aaattttatt 4200
taaaagtctc aggagagact tcccatcctg agaagatctc ttttcccttt tataatttag 4260
gtcctgaat aatcactgaa ttttctccat gtccatcta tagtactgtt atttctgttt 4320
tccttttttc ttaccacaaa gtatcttggt tttgctgtat gaaagaaaat gtgttattgt 4380
aatgtgaaat tctctgtccc tgcaggggcc cacatccgcc tcaatcccaa ataaacacac 4440
agaggctgta ttaattatga aactgttggt cagttggcta gggcttctta ttggctagct 4500
ctgtcttaat tattaacca taactactat tgtaagtatt tccatgtggt cttatcttac 4560
caaggaaagg gtccaggac ctcttactcc tctggcgtgt tggcagtga gaggagagag 4620
cgatttccta tttgtctctg cttattttct gattctgctc agctatgtca cttcctgcct 4680
ggccaatcag ccaatcagt ttttattcat tagccaataa aagaaacatt tacacagaag 4740
gacttcccc atcatgttat ttgtatgagt tcttcagaaa atcatagtat cttttaatac 4800
taatttttat aaaaaattaa ttgtattgaa aattatgtgt atatgtgtct gtgtgtcgat 4860

ttgtgctcat aagtagcatg gagtgcagaa gagggaatca gatctttttt taagggacaa 4920
agagttttatt cagattacat ttttaaggatga taatgtatga ttgcaagggtt atcaacatgg 4980
cagaaatgtg aagaagctgg tcacattaca tccagagtca agagtagaga gcaatgaatt 5040
gatgcatgca ttctgtgtct cagctcactt ttcttgagc lgagclgatt gtaagccatc 5100
tgatgtcttt gctgggaact aactcaaagg caagttcaaa acctgttctt aagtataagc 5160
catctctcca gtccctcata tggctctctta agacactttc tttatattct tgtacataga 5220
aattgaattc ctaacaactg cattcaaatt acaaaatagt ttttaaagc tgatataata 5280
aatgtaaata caatctagaa catttttata aataagcata ttaactcagt aaaaataaat 5340
gcatggttat ttctcttcat lagggaaagta tgtctcccca ggctgttctc tagattctac 5400
tagtaatgct gtttgtacac catccacagg ggttttatct taaagctaag acatgaatga 5460
tggacatgct tgttagcatt tagacttttt tcttactat aattgagcta gtatttttgt 5520
gctcagtttg atatctgtta attcagataa atgtaatagt aggttaatttc tttgtgataa 5580
aggcatataa attgaagttg gaaaacaaaa gcctgaaatg acagttttta agattcagaa 5640
caataatttt caaaagcagt tacccaactt tccaaataca atctgcagtt ttcttgatat 5700
gtgataaatt tagacaaaga aatagcacat tttaaaatag ctatttactc ttgatttttt 5760
tttcaaattt aggtagttc actagttgtg tgtaaggta tggctgcaaa catctttgac 5820
tcttggttag ggaatccagg atgatttacg tgtttgcca aaatcttggt ccattctggg 5880
tttcttctct atctaggtag ctagcacaag ttaaagggtg ggtagtattg gaaggctctc 5940

aggtatatat ttctatatcc tgtatTTTT tctctgtca tatatttgc ttctgtttta 6000
ttgatttcta ctgttagttt gatacttact ttcttacact ttctttggga tttattttgc 6060
tggtctaaga ttctcttagca agttcatatc actgatttta acagttgctt cttttgtaat 6120
atagactgaa tgccccttat ttgaaatgct tgggatcaga aactcagatt tgaacttttc 6180
ttttttaata ttccatcaa gtttaccage tgaatgtcct gatccaagaa tatgaaatct 6240
gaaatgcttt gaaatctgaa acttttagag tgataaagct tccctttaaa ttaatttgtg 6300
ttctatattt ttgacaatg tcaaccttc attgttatcc aatgagtga catattttca 6360
atttttttgt ttgatctgtt atattttgat ctgaccatat ttataaaatt ttatttaatt 6420
tgaatgttgt gctgttactt atctttatta ttatttttgc ttattttcta gccaaatgaa 6480
attatattct gtattatttt agtttgaatt ttactttgtg gcttagtaac tgccttttgt 6540
tggtgaatgc ttaagaaaaa cgtgtggtct actgatattg gttctaactt tatatagcat 6600
gttgtttgtt aggtagtga ttatgctggt cagattgtct tgagtttatg caaatgtaaa 6660
atatttagat gcttgttttg ttgtctaaga acaaagtatg cttgctgtct cctatcggtt 6720
ctggtttttc cattcatctc ttcaagctgt ttgtgtgtt gaatactaac tccgtactat 6780
cttgttttct gtgaattaac ccttttcaa aggtttcttt tctttttttt ttaaggac 6840
aacaagtta ttcagattac attttaagct gataatgtat gattgcaagg ttatcaacat 6900
ggcagaaatg tgaagaagct aggcacatta catccacatg gagtcaagag cagagagcag 6960
tgaattaatg catgcattcc tgtggtcage tcaactttcc tattcttaga tagtctagga 7020

tcataaacct ggggaatagt gctaccacaa tgggcatatc cacttacttc agttcatgca 7080
atcaaccaag gcacatccac aggaaaaact gatttagaca acctctcatt gagactcttc 7140
ccagatgatt agactgtgtc aagttgacaa ttaaaactat cacacctgaa gccatcacta 7200
gtaaatataa tgaaaatggt gattatcacc ataattcatc tgtatccctt tgttattgta 7260
gattttgtga agttcctatt caagtccttg ttcttctctt aaaaacctgt tttttagtta 7320
aataggtttt ttagtggtcc tgtctgtaaa tactttttta aagttagata ttattttcaa 7380
gtatgttctc ccagtccttg gcttgatatt tcateccttc aatacatata tttttgtaat 7440
ttattttttt tatttaaatt agaaacaaag ctgcttttac atgtcagtct cagttccctc 7500
tccctccctt cctccctgc tccccaccta agceccaatt ccaactcctt tcttctcccc 7560
aggaagggtg aggccctcca tgggggaaat cttcaatgtc tgtcatatca tttggagcag 7620
ggcctagacc ctccccagtg tgtctaggct gagagagtat cctctatgt ggagagggt 7680
cccaaagttc atttgtgtac taggggtaaa tactgatcca ctatcagtg ccccatagat 7740
tgtccggacc tccaaactga ctctctcctt cagggagtct ggaacagttc tatgctggtt 7800
tcccagatat cagtctgggg tccatgagca accccttggt caggtcagtt gtttctgtag 7860
gtttccccag cccggtcttg acccctttgc tcateccttc tccctctctg caactggatt 7920
ccagagttca gctcagtggt tagctgtggg tgtctgcatc tgcttccatc agctactgga 7980
tgagggtctt aggatggcat ataaggtagt catcagttc attatcagag aagggtttt 8040
aaggtagcct cttgattatt gcttagattg ttagttgggg tcaaccttgt aggtctctgg 8100

acagtgcag aattctcttt aaacctataa tggtccctc tgtggtggtt tcccttttct 8160
tgctctcatc cgttccctcc ctgactagat ctctctgctc cctcatgtcc tctctccccc 8220
tccccctctc ccttctcttt tcttctaaet cctctccccc tccacccaag atccccatta 8280
gcttatgaga tcttgtcctt attttagcaa aacctttttg gctataaaat taattaattt 8340
aatatgctta tatcaggttt attttggtta gtatttgtat gtgtttgggt agtgttttta 8400
accttaattg acatgtatcc ttatatattag acacagattt aaatatattga agtttttttt 8460
tttttttttt ttaaagattt atttattttt tatgtcttct gcctgcatgc cagaagaggg 8520
caccagatct cattcaaggt ggttgtgagc caccatgtgg ttgctgggaa ttgaactcag 8580
gacctctgga agaacagtca gtgtctttaa ccgtgagcc atctctccag cccctgaagt 8640
gttcttttta aagaggatag cagtgcacat ttttccctt tgaccaatga ctctacctt 8700
actgaattgt ttagccatt tataatgtaat gctgttacca ggtttacatt ttcttttctc 8760
ttgctaaaatt tcttccctgt ttgtctcatc tcttattttt gtctgttgga ttatataggc 8820
ttttattttt ctgtttttac agtaagtta atcaaattaa aattatttta tggaatgggt 8880
gtgttgacta catgtatgtc tgtgcacat glgtgacct ggtcttgcc agaagaaggt 8940
gtcatattct ctgaaactgg tattgtggat gttacgaact gccatagggt gctaggaatc 9000
aaacccccagc tctcttgga aagcagccac tgcctgagc cactgagtc tctcttcaag 9060
caggatgagc caacttttaa tggttaccag tggataagag tgcttgatc tctagacccc 9120
atgaaaattt atgcattgct atatgggctt gtcacttcag cattgtgtga cagagacagg 9180

aggatcccaa gagctc

9196

<210> 4

<211> 297

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met	Thr	Thr	Pro	Arg	Asn	Ser	Val	Asn	Gly	Thr	Phe	Pro	Ala	Glu	Pro
1				5					10					15	

Met	Lys	Gly	Pro	Ile	Ala	Met	Gln	Ser	Gly	Pro	Lys	Pro	Leu	Phe	Arg
			20					25						30	

Arg	Met	Ser	Ser	Leu	Val	Gly	Pro	Thr	Gln	Ser	Phe	Phe	Met	Arg	Glu
		35					40						45		

Ser	Lys	Thr	Leu	Gly	Ala	Val	Gln	Ile	Met	Asn	Gly	Leu	Phe	His	Ile
	50						55					60			

Ala	Leu	Gly	Gly	Leu	Leu	Met	Ile	Pro	Ala	Gly	Ile	Tyr	Ala	Pro	Ile
65					70					75					80

Cys	Val	Thr	Val	Trp	Tyr	Pro	Leu	Trp	Gly	Gly	Ile	Met	Tyr	Ile	Ile
				85					90					95	

Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Ala	Ala	Thr	Glu	Lys	Asn	Ser	Arg	Lys	Cys	Leu
			100					105					110		

Val	Lys	Gly	Lys	Met	Ile	Met	Asn	Ser	Leu	Ser	Leu	Phe	Ala	Ala	Ile
			115				120					125			

Ser	Gly	Met	Ile	Leu	Ser	Ile	Met	Asp	Ile	Leu	Asn	Ile	Lys	Ile	Ser
		130					135				140				

His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro
145 150 155 160

Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn
165 170 175

Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly
180 185 190

Ile Leu Ser Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile
195 200 205

Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys
210 215 220

Ser Asn Ile Val Leu Leu Ser Ala Glu Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile
225 230 235 240

Glu Ile Lys Glu Glu Val Val Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro
245 250 255

Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu Glu
260 265 270

Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser
275 280 285

Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro
290 295

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His
1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Ser Tyr Asn Met His
1

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val

1

5

10

<210> 11

<211> 384

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 11

atg gat ttt cag gtg cag att atc agc ttc ctg cta atc agt gct tca 48

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

1

5

10

15

gtc ata atg tcc aga gga caa att gtt ctc tcc cag tct cca gca atc 96

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile

20

25

30

ctg tct gca tct cca ggg gag aag gtc aca atg act tgc agg gcc agc 144

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser

35

40

45

tca agt gta agt tac atc cac tgg ttc cag cag aag cca gga tcc tcc 192

Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
 50 55 60

ccc aaa ccc tgg att tat gcc aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cct 240
 Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 gtt cgc ttc agt ggc agt ggg tct ggg act tct tac tct ctc acc atc 288
 Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95

agc aga gtg gag gct gaa gat gct gcc act tat tac tgc cag cag tgg 336
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 100 105 110

act agt aac cca ccc acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa atc aaa 384
 Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 12

<211> 128

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
 50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80

Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 100 105 110

Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 13

<211> 420

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 13

atg ggt tgg agc ctc atc ttg ctc ttc ctt gtc gct gtt gct acg cgt 48
 Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg
 1 5 10 15

gtc ctg tcc cag gta caa ctg cag cag cct ggg gct gag ctg gtg aag 96
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30

cct ggg gcc tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac aca ttt 144
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

acc agt tac aat atg cac tgg gta aaa cag aca cct ggt cgg ggc ctg 192
 Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu
 50 55 60

gaa tgg att gga gct att tat ccc gga aat ggt gat act tcc tac aat 240

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
 65 70 75 80

 cag aag ttc aaa ggc aag gcc aca ttg act gca gac aaa tcc tcc agc 288
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

 aca gcc tac atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc 336
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

 tat tac tgt gca aga tcg act tac tac ggc ggt gac tgg tac ttc aat 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn
 115 120 125

 gtc tgg ggc gca ggg acc acg gtc acc gtc tct gca 420
 Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala
 130 135 140

<210> 14

<211> 140

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg
 1 5 10 15

 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30

 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

 Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu
 50 55 60

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 16

gtgaccttct cccctggaga tgcagacagg attgctggag actgggagag aacaatttgt 60

cctctggaca ttatgactga agcactgatt a

91

<210> 17

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 17

ctccagggga gaaggtcaca atgacttgca gggccagctc aagtgtagt tacatccact 60

ggttcagca gaagccagga tcctcccca

90

<210> 18

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 18

ccagaccac tgccactgaa gcgaacaggg actccagaag ccaggttgga tgtggcataa 60

atccagggtt tgggggagga tcctggctt

89

<210> 19

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 19

tcagtggcag tgggtctggg acttcttact ctctacccat cagcagagtg gaggtgaag 60

atgctgccac ttattactgc cagcagtggga c 91

<210> 20

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 20

gttttcccag tcacgaccgt acgtttgatt tccagcttgg tccccctcc gaacgtgggt 60

gggttactag tccactgctg gcagtaataa 90

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 21

gtctgaagca ttatgtgttg aagc

24

<210> 22

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 22

gtgagtacat tcattgtact gtg

23

<210> 23

<211> 575

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 23

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe

1

5

10

15

Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp

20

25

30

Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala

35

40

45

Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala

50

55

60

Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr

65

70

75

80

Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln
85 90 95

Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Asp Leu Gly Lys Asp His
100 105 110

Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe
115 120 125

Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Lys Leu Glu Gly Asn Glu
130 135 140

Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu
145 150 155 160

Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala
165 170 175

Gly Glu Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln
180 185 190

Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg
195 200 205

Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu
210 215 220

His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr
225 230 235 240

Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu
245 250 255

Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu
260 265 270

Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Lys Asp Lys Asn Val Gln Val
275 280 285

Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu
290 295 300

Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His
305 310 315 320

Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile
325 330 335

Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Arg Glu Ile Glu Glu Thr Thr Lys Lys
340 345 350

Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp
355 360 365

Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val
370 375 380

His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Glu Arg Arg Met Lys Val Asp
385 390 395 400

Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ser Leu Leu Lys Glu
405 410 415

Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
420 425 430

Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
435 440 445

Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
450 455 460

Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
 465 470 475 480

Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
 485 490 495

Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro
 500 505 510

His Gln Pro Arg Thr Lys Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
 515 520 525

Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asn Gly Tyr Ser Lys Gly Val Asn
 530 535 540

Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
 545 550 555 560

Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
 565 570 575

<210> 24

<211> 575

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
 1 5 10 15

Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp
 20 25 30

Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala

35	40	45
Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala		
50	55	60
Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr		
65	70	75
Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln		
85	90	95
Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Gly Leu Gly Lys Asp His		
100	105	110
Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe		
115	120	125
Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys His Leu Glu Gly Asn Glu		
130	135	140
Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu		
145	150	155
Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala		
165	170	175
Gly Asp Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln		
180	185	190
Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg		
195	200	205
Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu		
210	215	220
His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr		

225	230	235	240
Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu			
	245	250	255
Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu			
	260	265	270
Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Asn Asp Lys Asn Ile Gln Val			
	275	280	285
Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu			
	290	295	300
Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His			
305	310	315	320
Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile			
	325	330	335
Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys			
	340	345	350
Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp			
	355	360	365
Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val			
	370	375	380
His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp			
385	390	395	400
Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Thr Leu Leu Lys Glu			
	405	410	415

Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
420 425 430

Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
435 440 445

Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
450 455 460

Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
465 470 475 480

Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
485 490 495

Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro
500 505 510

His Lys Pro Arg Thr Glu Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
515 520 525

Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Ile Asn
530 535 540

Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
545 550 555 560

Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
565 570 575

<210> 25

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 25

caggaaacag ctatgacgcg gccgcgaccc ctcacatgg gttggagcct catcttgctc 60

ttecttgctg ctgttgctac gcgtgtcctg tcccaggtg

99

<210> 26

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 26

atgtgtagcc agaagccttg caggacatct tctactgagge cccagccttc accagctcag 60

ccccaggctg ctgcagttgt acctgggaca ggacacgc

98

<210> 27

<211> 97

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 27

caaggcttct ggctacacat ttaccagtta caatatgcac tgggtaaaac agacacctgg 60

tcggggcctg gaatggattg gagctattta tcccgga

97

<210> 28

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 28

gtaggctgtg ctggaggatt tgtctgcagt caatgtggcc ttgcctttga acttctgatt 60

gtaggaagta tcaccatttc cgggataaat agctccaat

99

<210> 29

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 29

aatcctccag cacagcctac atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct 60

attactgtgc aagatcgact tactacggcg gtgactggt

99

<210> 30

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 30

gttttcccag tcacgacggg cccttggtgg aggctgcaga gacggtgacc gtggtccctg 60

cgccccagac attgaagtac cagtcaccgc cgtagtaa

98

<210> 31

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 31

gagctggtga agcctggggc ctcag

25

<210> 32

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 32

atgggtcaag ctcccgctaa gtgcccga

28

<210> 33

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 33

tcaagcgttt gggttgtcc tcatgag

27

<210> 34

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 34

tccggggatg gcgagatggg caagc

25

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 35

cttgacatgg ctctgggctc caag

24

<210> 36

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 36

ccacttcagt cggtcggtag tattt

25

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 37

cgctcacccg cctgaggcga catg

24

<210> 38

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 38

ggcaggtgct gtcggtgagg tcaccatagt gc

32

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 39

ggggccatgc caaggactat gtcg

24

<210> 40

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 40

atgtggctga tgttacaaaa tgatg

25

<210> 41

<211> 1504

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1119)

<400> 41

atg gct cac gct ccc gct agc tgc ccg agc tcc agg aac tct ggg gac 48
Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp

1	5	10	15	
ggc gat aag ggc aag ccc agg aag gtg gcg ctc atc acg ggc atc acc	96			
Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr				
20	25	30		
ggc cag gat ggc tca tac ttg gca gaa ttc ctg ctg gag aaa gga tac	144			
Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr				
35	40	45		
gag gtt cat gga att gta cgg cga tcc agt tca ttt aat aca ggt cga	192			
Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg				
50	55	60		
att gaa cat tta tat aag aat cca cag gct cat att gaa gga aac atg	240			
Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met				
65	70	75	80	
aag ttg cac tat ggt gac ctc acc gac agc acc tgc cta gta aaa atc	288			
Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile				
85	90	95		
atc aat gaa gtc aaa cct aca gag atc tac aat ctt ggt gcc cag agc	336			
Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser				
100	105	110		
cat gtc aag att tcc ttt gac tta gca gag tac act gca gat gtt gat	384			
His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp				
115	120	125		
gga gtt ggc acc ttg cgg ctt ctg gat gca att aag act tgt ggc ctt	432			
Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu				
130	135	140		
ata aat tct gtg aag ttc tac cag gcc tca act agt gaa ctg tat gga	480			
Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly				

145	150	155	160	
aaa gtg caa gaa ata ccc cag aaa gag acc acc cct ttc tat cca agg	528			
Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg				
165	170	175		
tcg ccc tat gga gca gcc aaa ctt tat gcc tat tgg att gta gtg aac	576			
Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn				
180	185	190		
ttt cga gag gct tat aat ctc ttt gcg gtg aac ggc att ctc ttc aat	624			
Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn				
195	200	205		
cat gag agt cct aga aga gga gct aat ttt gtt act cga aaa att agc	672			
His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser				
210	215	220		
cgg tca gta gct aag att tac ctt gga caa ctg gaa tgt ttc agt ttg	720			
Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu				
225	230	235	240	
gga aat ctg gac gcc aaa cga gac tgg ggc cat gcc aag gac tat gtc	768			
Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val				
245	250	255		
gag gct atg tgg ctg atg tta caa aat gat gaa cca gag gac ttt gtc	816			
Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val				
260	265	270		
ata gct act ggg gaa gtt cat agt gtc cgt gaa ttt gtt gag aaa tca	864			
Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser				
275	280	285		
ttc atg cac att gga aag acc att gtg tgg gaa gga aag aat gaa aat	912			
Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn				

290	295	300	
gaa gtg ggc aga tgt aaa gag acc ggc aaa att cat gtg act gtg gat			960
Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp			
305	310	315	320
ctg aaa tac tac cga cca act gaa gtg gac ttc ctg cag gga gac tgc			1008
Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys			
	325	330	335
tcc aag gcg cag cag aaa ctg aac tgg aag ccc cgc gtt gcc ttt gac			1056
Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp			
	340	345	350
gag ctg gtg agg gag atg gtg caa gcc gat gtg gag ctc atg aga acc			1104
Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr			
	355	360	365
aac ccc aac gcc tga gcacctctac aaaaaaatc gcgagacatg gactatggtg			1159
Asn Pro Asn Ala			
	370		
cagagccagc caaccagagt ccagccactc ctgagaccat cgaccataaa cctcgactg			1219
cctgtgtcgt cccacagct aagagctggg ccacaggttt gtgggcacca ggacggggac			1279
actccagagc taaggccact tcgcttttgt caaaggctcc tctcaatgat tttgggaaat			1339
caagaagttt aaaatcacat actcatttta cttgaaatta tgctactaga caacttaa			1399
ttttgagtct tgagattgtt tttctctttt cttattaaat gatctttcta tgaccagca			1459
aaaaaaaaa aaaaaaggga tataaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa			1504

<210> 42

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 42

gccatccaga aggtggt

17

<210> 43

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 43

gtcttgtcag ggaagat

17

<210> 44

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 44

ggcaggagac caccttgcca gtgcccac

28

<210> 45

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 45

gggtgggctg taccttctgg aacagggc

28

<210> 46

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 46

ggcgtggct taccggaga ggaatggg

28

<210> 47

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 47

ggaatgggtg tttgtctctc caaatgac

28

<210> 48

<211> 1316

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 48

gccccgcccc ctccacctgg accgagagta gctggagaat tgtgcaccgg aagtagctct 60

tggactggtg gaacctgcg caggtgcage aacaatgggt gagccccagg gatccaggag 120
gatcctagtg acagggggct ctggactggt gggcagagct atccagaagg tggtcgcaga 180
tggcgctggc ttacccggag aggaatgggt gtttgtctcc tccaaagatg cagatctgac 240
ggatgcagca caaacccaag cctgtttcca gaaggtacag cccacccatg tcatccatct 300
tgctgcaatg gtaggaggcc ttttcggaa tatcaatac aacttggatt tctggaggaa 360
gaatgtgcac atcaatgaca acgtcctgca ctgagcttcc gaggtgggca ctgcgaaggt 420
ggtctcctgc ctgtccacct gtatcttccc tgacaagacc acctatccta ttgatgaaac 480
aatgatccac aatggtccac cccacagcag caattttggg tactcgtatg ccaagaggat 540
gattgacgtg cagaacaggg cctacttcca gcagcatggc tgcaccttca ctgctgtcat 600
ccctaccaat gtctttggac ctcatgacaa ctccaacatt gaagatggcc atgtgctgcc 660
tggcctcatc cataaggtgc atctggccaa gagtaatggt tcagccttga ctgtttgggg 720
tacagggaaa ccacggaggc agttcatcta ctcaactggc ctgccccggc tcttcatctg 780
ggtcctgcgg gagtacaatg aagttgagcc catcatcctc tcagtgggcg aggaagatga 840
agtctccatt aaggaggcag ctgaggctgt agtggaggcc atggacttct gtggggaagt 900
cacttttgat tcaacaaagt cagatgggca gtataagaag acagccagca atggcaagct 960
tcgggcctac ttgcctgatt tccgtttcac acccttcaag caggctgtga aggagacctg 1020
tgcttggttc accgacaact atgagcaggc ccggaagtga agcatgggac aagcgggtgc 1080
tcagctggca atgcccagtc agtaggctgc agtctcatca tttgcttgtc aagaactgag 1140

gacagtatcc agcaacctga gccacatgct ggtctctctg ccagggggct tcatgcagcc 1200
atccagtagg gcccatgttt gtccatcctc gggggaaggc cagaccaaca ccttgtttgt 1260
ctgcttctgc cccaacctca gtgcatccat gctggtcctg ctgtcccttg tctaga 1316

<210> 49

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 49

gacctctgctg ggaccaaaat tgg 23

<210> 50

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 50

cttaacatcc caagggatgc tg 22

<210> 51

<211> 1965

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 51

acgggggggct cccggaagcg gggaccatgg cgtctctgcg cgaagcgagc ctgcggaagc 60

tgcggcgctt ttccgagatg agaggcaaac ctgtggcaac tgggaaattc tgggatgtag 120

ttgtaataac agcagctgac gaaaagcagg agcttgctta caagcaacag ttgtcggaga 180

agctgaagag aaaggaattg ccccttggag ttaactacca tgttttcact gatcctcctg 240

gaacccaaat tggaaatgga ggatcaacac tttgttctct tcagtgcctg gaaagcctct 300

atggagacaa gtggaattcc ttcacagtcc tgtaattca ctctggtggc tacagtcaac 360

gacttcccaa tgcaagcgct ttaggaaaaa tcttcacggc tttaccactt ggtgagccca 420

tttatcagat gttggactta aaactagcca tgtacatgga tttcccctca cgcatagaagc 480

ctggagtttt ggtcacctgt gcagatgata ttgaactata cagcattggg gactctgagt 540

ccattgcatt tgagcagcct ggctttactg ccctagccca tccatctagt ctggctgtag 600

gcaccacaca tggagtatit gtattggact ctgcgggttc ttgcaacat ggtgacctag 660

agtacaggca atgccaccgt ttctccata agcccagcat tgaaaacatg caccacttta 720

atgccgtgca tagactagga agctttggtc aacaggactt gagtgggggt gacaccacct 780

gtcatccatt gcactctgag tatgtctaca cagatagcct attttacatg gatcataaat 840

cagccaaaaa gctacttgat ttctatgaaa gtgtaggccc actgaactgt gaaatagatg 900

cctatgggtga ctttctgcag gcaactgggac ctggagcaac tgcagagtac accaagaaca 960

cctcacacgt cactaaagag gaatcacact tgttggacat gaggcagaaa atattccacc 1020

tcctcaaggg aacacccctg aatgttggtg tccttaataa ctccagggtt tatcacattg 1080

gaacaacgga ggagtatctg ctacatttca cttccaatgg ttcgttacag gcagagctgg 1140
gcttgcaatc catagctttc agtgtctttc caaatgtgcc tgaagactcc catgagaaac 1200
cctgtgtcat tcacagcatc ctgaattcag gatgctgtgt ggcccttgge tcagtggtag 1260
aatattccag attaggacct gaggtgtcca tctcgaaaa ctgcattatc agcggttctg 1320
tcatagaaaa agctgtttctg ccccatgtt ctttctgtgt ctctttaagt gtggagataa 1380
atggacactt agaattattca actatgggtg ttggcatgga agacaacttg aagaacagtg 1440
ttaaaacct atcagatata aagatgttc agttctttgg agtctgtttc ctgacttggt 1500
tagatatgtg gaaccttaaa gctatggaag aactattttc aggaagtaag acgcagctga 1560
gcctgtggac tgctcgaatt ttccctgtct gttcttctct gagtgagtcg gttgcagcat 1620
cccttgggat gttaaagcc attcgaaacc attcgccatt cagcctgagc aacttcaagc 1680
tgctgtccat ccaggaaatg cttctctgca aagatgtagg agacatgctt gcttacaggg 1740
agcaactctt tctagaaatc agttcaaaga gaaaacagtc tgattcggag aaatcttaaa 1800
tacaatggat ttgcctgga aacaggattg caaatgcagg catattctat agatctctgg 1860
gttcttcttt cttctcccc tctctccttt ctttccctt tgatgtaatg acaaaggtaa 1920
aaatggccac ttctgatgga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1965

<210> 52

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 52

caggggtgtt cccttgagga ggtggaa

27

<210> 53

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 53

cactgagcca ggggccacac agcatcc

27

<210> 54

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 54

cccctcacgc atgaagcctg gag

23

<210> 55

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 55

tgccaccgtt tcttcataa gcccgagc

27

<210> 56

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 56

atgaagttgc actatggtga cctca

25

<210> 57

<211> 59

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 57

ccgacagcac ctgcctagta aaaatcatca atgaagtcaa acctacagag atctacaat 59

<210> 58

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 58

gacttagcag agtacactgc agatg

25

<210> 59

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 59

accttgata gaaaggggtg gtctc

25

<210> 60

<211> 125

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 60

ttgatggagt tggcaccttg cggcttcttg atgcaattaa gacttgtggc cttataaatt 60
ctgtgaagtt ctaccaggcc tcaactagtg aactgtatgg aaaagtgcaa gaaatacccc 120
agaaa 125

<210> 61

<211> 372

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 61

Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp
1 5 10 15

Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr
20 25 30

Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr
35 40 45

Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg
50 55 60

Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met
65 70 75 80

Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile
85 90 95

Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser
100 105 110

His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp
115 120 125

Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu
130 135 140

Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly
145 150 155 160

Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg
165 170 175

Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn
180 185 190

Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn
195 200 205

His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser
210 215 220

Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu
225 230 235 240

Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val
245 250 255

Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val
260 265 270

Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser
275 280 285

Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn
290 295 300

Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp
305 310 315 320

Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys
325 330 335

Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp
340 345 350

Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr
355 360 365

Asn Pro Asn Ala
370

<210> 62

<211> 321

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 62

Met Gly Glu Pro Gln Gly Ser Arg Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Leu Val Gly Arg Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly
20 25 30

Leu Pro Gly Glu Glu Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu
35 40 45

Thr Asp Ala Ala Gln Thr Gln Ala Leu Phe Gln Lys Val Gln Pro Thr
50 55 60

His Val Ile His Leu Ala Ala Met Val Gly Gly Leu Phe Arg Asn Ile
65 70 75 80

Lys Tyr Asn Leu Asp Phe Trp Arg Lys Asn Val His Ile Asn Asp Asn
85 90 95

Val Leu His Ser Ala Phe Glu Val Gly Thr Arg Lys Val Val Ser Cys
100 105 110

Leu Ser Thr Cys Ile Phe Pro Asp Lys Thr Thr Tyr Pro Ile Asp Glu
115 120 125

Thr Met Ile His Asn Gly Pro Pro His Ser Ser Asn Phe Gly Tyr Ser
130 135 140

Tyr Ala Lys Arg Met Ile Asp Val Gln Asn Arg Ala Tyr Phe Gln Gln
145 150 155 160

His Gly Cys Thr Phe Thr Ala Val Ile Pro Thr Asn Val Phe Gly Pro
165 170 175

His Asp Asn Phe Asn Ile Glu Asp Gly His Val Leu Pro Gly Leu Ile
180 185 190

His Lys Val His Leu Ala Lys Ser Asn Gly Ser Ala Leu Thr Val Trp
195 200 205

Gly Thr Gly Lys Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala
210 215 220

Arg Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Asn Glu Val Glu Pro Ile
225 230 235 240

Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala
245 250 255

Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe Cys Gly Glu Val Thr Phe Asp
260 265 270

Ser Thr Lys Ser Asp Gly Gln Tyr Lys Lys Thr Ala Ser Asn Gly Lys
275 280 285

Leu Arg Ala Tyr Leu Pro Asp Phe Arg Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala
290 295 300

Val Lys Glu Thr Cys Ala Trp Phe Thr Asp Asn Tyr Glu Gln Ala Arg
305 310 315 320

Lys

<210> 63

<211> 590

<212> PRT

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 63

Met Ala Ser Leu Arg Glu Ala Ser Leu Arg Lys Leu Arg Arg Phe Ser
 1 5 10 15
 Glu Met Arg Gly Lys Pro Val Ala Thr Gly Lys Phe Trp Asp Val Val
 20 25 30
 Val Ile Thr Ala Ala Asp Glu Lys Gln Glu Leu Ala Tyr Lys Gln Gln
 35 40 45
 Leu Ser Glu Lys Leu Lys Arg Lys Glu Leu Pro Leu Gly Val Asn Tyr
 50 55 60
 His Val Phe Thr Asp Pro Pro Gly Thr Lys Ile Gly Asn Gly Gly Ser
 65 70 75 80
 Thr Leu Cys Ser Leu Gln Cys Leu Glu Ser Leu Tyr Gly Asp Lys Trp
 85 90 95
 Asn Ser Phe Thr Val Leu Leu Ile His Ser Gly Gly Tyr Ser Gln Arg
 100 105 110
 Leu Pro Asn Ala Ser Ala Leu Gly Lys Ile Phe Thr Ala Leu Pro Leu
 115 120 125
 Gly Glu Pro Ile Tyr Gln Met Leu Asp Leu Lys Leu Ala Met Tyr Met
 130 135 140
 Asp Phe Pro Ser Arg Met Lys Pro Gly Val Leu Val Thr Cys Ala Asp
 145 150 155 160
 Asp Ile Glu Leu Tyr Ser Ile Gly Asp Ser Glu Ser Ile Ala Phe Glu
 165 170 175
 Gln Pro Gly Phe Thr Ala Leu Ala His Pro Ser Ser Leu Ala Val Gly
 180 185 190

Thr Thr His Gly Val Phe Val Leu Asp Ser Ala Gly Ser Leu Gln His
 195 200 205

Gly Asp Leu Glu Tyr Arg Gln Cys His Arg Phe Leu His Lys Pro Ser
 210 215 220

Ile Glu Asn Met His His Phe Asn Ala Val His Arg Leu Gly Ser Phe
 225 230 235 240

Gly Gln Gln Asp Leu Ser Gly Gly Asp Thr Thr Cys His Pro Leu His
 245 250 255

Ser Glu Tyr Val Tyr Thr Asp Ser Leu Phe Tyr Met Asp His Lys Ser
 260 265 270

Ala Lys Lys Leu Leu Asp Phe Tyr Glu Ser Val Gly Pro Leu Asn Cys
 275 280 285

Glu Ile Asp Ala Tyr Gly Asp Phe Leu Gln Ala Leu Gly Pro Gly Ala
 290 295 300

Thr Ala Glu Tyr Thr Lys Asn Thr Ser His Val Thr Lys Glu Glu Ser
 305 310 315 320

His Leu Leu Asp Met Arg Gln Lys Ile Phe His Leu Leu Lys Gly Thr
 325 330 335

Pro Leu Asn Val Val Val Leu Asn Asn Ser Arg Phe Tyr His Ile Gly
 340 345 350

Thr Thr Glu Glu Tyr Leu Leu His Phe Thr Ser Asn Gly Ser Leu Gln
 355 360 365

Ala Glu Leu Gly Leu Gln Ser Ile Ala Phe Ser Val Phe Pro Asn Val
 370 375 380

Pro Glu Asp Ser His Glu Lys Pro Cys Val Ile His Ser Ile Leu Asn
 385 390 395 400

Ser Gly Cys Cys Val Ala Pro Gly Ser Val Val Glu Tyr Ser Arg Leu
 405 410 415

Gly Pro Glu Val Ser Ile Ser Glu Asn Cys Ile Ile Ser Gly Ser Val
 420 425 430

Ile Glu Lys Ala Val Leu Pro Pro Cys Ser Phe Val Cys Ser Leu Ser
 435 440 445

Val Glu Ile Asn Gly His Leu Glu Tyr Ser Thr Met Val Phe Gly Met
 450 455 460

Glu Asp Asn Leu Lys Asn Ser Val Lys Thr Ile Ser Asp Ile Lys Met
 465 470 475 480

Leu Gln Phe Phe Gly Val Cys Phe Leu Thr Cys Leu Asp Ile Trp Asn
 485 490 495

Leu Lys Ala Met Glu Glu Leu Phe Ser Gly Ser Lys Thr Gln Leu Ser
 500 505 510

Leu Trp Thr Ala Arg Ile Phe Pro Val Cys Ser Ser Leu Ser Glu Ser
 515 520 525

Val Ala Ala Ser Leu Gly Met Leu Asn Ala Ile Arg Asn His Ser Pro
 530 535 540

Phe Ser Leu Ser Asn Phe Lys Leu Leu Ser Ile Gln Glu Met Leu Leu
 545 550 555 560

Cys Lys Asp Val Gly Asp Met Leu Ala Tyr Arg Glu Gln Leu Phe Leu
 565 570 575

Glu Ile Ser Ser Lys Arg Lys Gln Ser Asp Ser Glu Lys Ser
580 585 590

出願人又は代理人の書類記号	1 4 4 0	国際出願番号	
---------------	---------	--------	--

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。	
7 4	頁、 1 4 行
B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号 305-8566）	
寄託の日付 21.12.01	受託番号 FERM BP-7834
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/>	
ヨーロッパ特許が求められているそれぞれの指定国については、寄託微生物の標本の分譲は欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許出願が拒絶され、取下げられ若しくは取下げられたとみなされる日まで標本の請求人により指名された専門家に分譲することによってのみ可能である（Rule 28 (4) EPC）。	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）	
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない） 下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示対項を明記する）	

受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した 25.12.02
権限のある職員 山田 孝人

国際事務局記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 24 JANUARY 2002
権限のある職員 中村 由香里

出願人又は代理人の書類記号	1 4 4 0	国際出願番号	
---------------	---------	--------	--

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。	
8 9	2 7
頁、 行	
B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号 305-8566）	
寄託の日付 26.03.02	受託番号 FERM BP-7976
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/>	
<p>ヨーロッパ特許が求められているそれぞれの指定国については、寄託微生物の標本の分譲は欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許出願が拒絶され、取下げられ若しくは取下げられたとみなされる日まで標本の請求人により指名された専門家に分譲することによってのみ可能である（Rule 28 (4) EPC）。</p>	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）	
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）	
下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
25.12.02
権限のある職員 山田 雄

国際事務局記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日
24 FEBRUARY 2003
権限のある職員 中村 由香里

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13534

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N5/10, C12N15/00, A01K67/027, A01H5/00, C07K16/28, A61K39/395, A61P35/00, A61P37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N5/10, C12N15/00, A01K67/027, A01H5/00, C07K16/28, A61K39/395, A61P35/00, A61P37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, BIOSIS, PIR/SWISSPROT/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	SHINKAWA T. et al., The Absence of Fucose but Not the Presence of Galactose or Bisecting N-Acetylglucosamine of Human IgG1 Complex-type Oligosaccharides Shows the Critical Role of Enhancing Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity. J.Biol.Chem., Jan.2003, Vol.278, No.5, pages 3466 to 3473	1-48
A	Esohe E. Idusogie et al., Mapping of the Clq Binding Site on Rituxan, a Chimeric Antibody with a Human IgG1 Fc. J.Immunol., 2000, Vol.164, pages 4178 to 4184	1-48

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
04 March, 2003 (04.03.03)

Date of mailing of the international search report
18 March, 2003 (18.03.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13534

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Davies J. et al., Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII. Biotechnol.Bioeng., Aug.2001, Vol.74, No.4, pages 288 to 294	1-48
P,A	WO 02/31140 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 18 April, 2002 (18.04.02), (Family: none)	1-48
A	US 5869307 A (Genetics Inst. Inc.), 09 February, 1999 (09.02.99), (Family: none)	4-6
A	WO 99/64618 A1 (DCV INC. DBA BIO-TECH RESOURCES), 16 December, 1999 (16.12.99), & EP 1084267 A & JP 2002-517256 A	4, 7, 8
A	WO 97/37683 A1 (CYTEL CORP.), 16 October, 1997 (16.10.97), & EP 904101 A1 & JP 2002-503082 A	4, 9, 10
A	Hayashi H. et al., Molecular cloning of mouse alpha-1,6-fucosyltransferase and expression of its mRNA in the developing cerebrum. DNA Seq., 2000, Vol.11, No.1-2, pages 91 to 96	11-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 5/10, C12N 15/00, A01K 67/027, A01H 5/00, C07K 16/28, A61K 39/395, A61P 35/00, A61P 37/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 5/10, C12N 15/00, A01K 67/027, A01H 5/00, C07K 16/28, A61K 39/395, A61P 35/00, A61P 37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, BIOSIS, PIR/SWISSPROT/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
T	Shinkawa T et al. The Absence of Fucose but Not the Presence of Galactose or Bisecting N-Acetylglucosamine of Human IgG1 Complex-type Oligosaccharides Shows the Critical Role of Enhancing Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity. J. Biol. Chem., Jan. 2003, Vol. 278, No. 5, P. 3466-3473	1-48
A	Esohe E. Idusogie et al. Mapping of the Clq Binding Site on Rituxan, a Chimeric Antibody with a Human IgG1 Fc. J. Immunol., 2000, Vol. 164, P. 4178-4184	1-48

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.03.03

国際調査報告の発送日

18.03.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4B

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Davies J et al. Expression of GnTIII in a recombinant anti-C D20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through high er affinity for FC gamma RIII. Biotechnol. Bioeng., Aug. 2001, Vol. 74, No. 4, P. 288-294	1 - 4 8
P, A	WO 02/31140 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2002.04.18 (ファミリーなし)	1 - 4 8
A	US 5869307 A (Genetics Inst Inc.) 1999.02.09 (ファミリーなし)	4 - 6
A	WO 99/64618 A1 (DCV INC DBA BIO-TECH RESOURCES) 1999.12.16 & EP 1084267 A & JP 2002-517256 A	4, 7, 8
A	WO 97/37683 A1 (CYTEL CORP.) 1997.10.16 & EP 904101 A1 & JP 2002-503082 A	4, 9, 10
A	Hayashi H et al. Molecular cloning of mouse alpha-1,6-fucosyl transferase and expression of its mRNA in the developing ce rebrum. DNA Seq., 2000, Vol. 11, No. 1-2, P. 91-96	11 - 13